



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Instituto Superior de Agronomia

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE DIETAS COM LÍPIDOS DE ORIGEM MARINHA
NA COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS DA CARNE DE BORREGO**

Ana Maria Coelho de Magalhães Ferreira

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José António Mestre Prates

Doutora Ana Cristina Saragoça Melgado Gonçalves Monteiro

Doutora Susana Paula Almeida Alves

ORIENTADOR

Doutora Susana Paula Almeida Alves

CO-ORIENTADOR

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Instituto Superior de Agronomia

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE DIETAS COM LÍPIDOS DE ORIGEM MARINHA
NA COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS DA CARNE DE BORREGO**

Ana Maria Coelho de Magalhães Ferreira

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA/PRODUÇÃO
ANIMAL**

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José António Mestre Prates

Doutora Ana Cristina Saragoça Melgado Gonçalves Monteiro

Doutora Susana Paula Almeida Alves

ORIENTADOR

Susana Paula Almeida Alves

CO-ORIENTADOR

Rui José Branquinho de Bessa

2016

LISBOA

Agradecimentos

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, existem variadíssimos fatores de natureza diversa que contribuíram para a realização do presente documento. Por isto, não posso deixar de agradecer a todos os que participaram de alguma forma na concretização deste trabalho:

Em primeiro lugar à Susana Alves por me ter orientado da melhor forma, estando sempre disponível para responder e ajudar em todas as minhas questões. Foi sem dúvida um grande apoio ao longo de todo este trabalho;

Ao professor Rui Bessa, meu co-orientador, pelo tempo despendido e pelo conhecimento científico que me transmitiu. Por todas as críticas e correções ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus pais por me darem a hipótese de frequentar o Mestrado em Engenharia Zootécnica/Produção animal. Por todo apoio a vários níveis, sem eles não teria conseguido finalizar esta importante etapa do meu percurso académico;

À Alice Cappuci e Mónica Costa pela boa disposição, apoio e transmissão de conhecimentos;

À Madalena Serradas Perdigoto, Carolina Duarte, Margarida Colares, Joana Pereira e António Pinheiro de Lacerda, que me acompanharam e ajudaram ao longo destes dois anos.

Resumo

O interesse em estudar a composição em ácidos gordos (AG) da carne de ruminantes advém da necessidade de descobrir diferentes vias para produzir carne mais saudável, isto é, com um teor de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) mais elevado comparativamente ao teor de ácidos gordos saturados (SFA) e um balanço mais favorável entre os PUFA ómega-6 e ómega-3. O estudo realizado examinou os efeitos de diferentes fontes de PUFA de cadeia muito longa (LCPUFA) ómega-3 na composição de AG do músculo e da gordura subcutânea (GSC) de borregos. Assim, os principais objetivos deste estudo foram verificar de que forma a suplementação da dieta de borregos com lípidos de origem marinha (óleo de peixe e microalgas) afetou a composição de AG do músculo de borregos através da comparação do teor e tipo de AG das frações lipídicas do músculo (lípidos neutros e polares) e da GSC de borregos e se os AG provenientes das algas e do óleo de peixe se depositaram em quantidades significativas na carne ou na GSC. O ensaio foi realizado no INIAV-Santarém, em que foram utilizados 36 borregos Merino Branco, divididos em 3 grupos de 12 animais cada. O ensaio foi realizado durante 6 semanas, após uma semana de adaptação em que a dieta foi introduzida progressivamente. Os três grupos experimentais foram sujeitos a diferentes dietas: controlo, óleo de peixe e algas. Em geral, houve uma redução do 18:0 e uma acumulação de 18:1*trans* nos tecidos dos animais suplementados com lípidos de origem marinha comparativamente ao controlo, o que sugere a inibição do último passo da biohidrogenação ruminal. A suplementação das dietas com óleo de peixe e algas conduziram a um aumento de LCPUFA *n*-3 e CLA α 9 β 11 na carne e na gordura dos borregos. No entanto, os níveis mais elevados de CLA α 9 β 11 foram verificados no tratamento com óleo de peixe, o que sugere uma menor atividade da enzima Δ 9-desaturase no tratamento com algas relativamente ao do óleo de peixe.

Palavras-chave: ácidos gordos, PUFA ómega-3, óleo de peixe, algas, DHA, EPA, biohidrogenação, triacilgliceróis, fosfolípidos.

Abstract

The interest in study the fatty acid composition of ruminant meat comes from the need to find different ways to produce meat with a higher content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) compared to saturated fatty acids and a favorable balance between PUFA omega-6 and omega-3. This study examined the effects of different marine sources in the fatty acid composition of subcutaneous fat and muscle of lambs. Thus, the aims of this study was verify if the dietary supplementation of lipids from marine sources (fish oil and microalgae) had an effect on the fatty acid composition of lambs muscle and compare the content and type of fatty acids in lipid muscle fractions (neutral and polar lipids) and subcutaneous fat, and also understand if fatty acids from algae and fish oil were deposited in significant quantities in these tissues. The experiment was conducted at INIAV-Santarem, where 36 Merino Branco lambs were divided into 3 groups of 12 animals each. The experiment was conducted over 6 weeks after one week of adaptation to the diet. The three groups were subjected to different diets: control, fish oil and algae. Overall, there was a reduction of 18:0 and an accumulation of 18:1 *trans* in the tissues of animals supplemented with marine lipids compared to control, suggesting an inhibition of the last biohydrogenation step. Supplementation of diets with fish oil and algae led to an increase of *n*-3 LCPUFA and CLAc9 τ 11 in meat and subcutaneous fat of lambs. However, the highest levels of CLAc9 τ 11 were observed with the fish oil treatment suggesting a reduced Δ 9-desaturase enzyme activity on animals fed algae compared to those fed fish oil.

Keywords: fatty acids, PUFA omega-3, fish oil, algae, DHA, EPA, biohydrogenation, triacylglycerol, phospholipids.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas.....	viii
Abreviaturas	ix
Introdução.....	1
1. Revisão Bibliográfica	2
1.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARNE E EFEITOS DOS ÁCIDOS GORDOS ÓMEGA-3 NA SAÚDE HUMANA	2
1.1.1. Composição química da carne.....	2
1.1.2. Ácidos gordos na carne	2
1.1.3. Ácidos gordos ómega-3 e efeitos na saúde	4
1.1.4. Ácido linolénico e ácido linoleico.....	4
1.1.5. Ácido linoleico conjugado.....	5
1.2. METABOLISMO LIPÍDICO DO RÚMEN.....	7
1.2.1 Digestão lipídica.....	8
1.3. ABSORÇÃO E TRANSPORTE DE LÍPIDOS.....	11
1.4. DEPOSIÇÃO E SÍNTESE DE ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO E NA GORDURA SUBCUTÂNEA.....	12
1.5. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE FONTES DE ÁCIDOS GORDOS ÓMEGA-3 NAS DIETAS DOS RUMINANTES NA FRAÇÃO LIPÍDICA DA CARNE E GORDURA.....	13
1.5.1. Suplementação lipídica da dieta dos ruminantes	14
1.6. OBJETIVOS	15

2. Materiais e Métodos	16
2.1. EXTRAÇÃO DE LÍPIDOS.....	17
2.2. SEPARAÇÃO DE LÍPIDOS NEUTROS E LÍPIDOS POLARES	17
2.3. TRANSESTERIFICAÇÃO COMBINADA DOS ÁCIDOS GORDOS DO MÚSCULO E DA GORDURA SUBCUTÂNEA.....	18
2.4. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA	19
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
2.6. RESULTADOS.....	19
2.6.1. Composição em ácidos gordos nas dietas fornecidas.....	19
2.6.2. Composição em ácidos gordos nas frações lipídicas da carne	20
2.6.3. Composição em ácidos gordos na gordura subcutânea.....	25
2.7. DISCUSSÃO	28
2.8. CONCLUSÃO.....	32
Bibliografia.....	33
Anexos	42
ANEXO I	43
ANEXO II	44

Índice de figuras

Figura 1: Vias metabólicas para a conversão do ácido linoleico e do ácido α -linolénico da dieta em ácidos gordos de cadeia longa. <i>Fonte:</i> (FAO, 2010).....	5
Figura 2: Esquema da síntese dos ácidos ruménico (18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11) e vacénico (18:1 <i>trans</i> -11) por via de bioidrogenação e via endógena. <i>Fonte:</i> (Costa <i>et al.</i> , 2009).6	6
Figura 3: Representação esquemática do trato digestivo de ruminantes salientando os compartimentos gástricos (Addison Wesley Longman Inc, 1999).	7
Figura 4: Representação esquemática dos produtos libertados durante a lipólise.	9
Figura 5: Esquema representativo das reações de isomerização e hidrogenação dos ácidos gordos essenciais linoleico e linolénico.....	10
Figura 6: Sistema de “SPE vacuum manifold” e colunas de SPE Lichrolut Si, 40-63 μ m, 500mg/3 mL.....	18
Figura 7: Cromatografia em camada fina utilizando-se hexano/éter/metanol/ácido acético (90:20:5:2, v/v/v/v) como eluente para deteção de lípidos neutros e polares através de vapores de iodo.....	18
Figura 8: Teor em LCPUFA <i>n</i> -3 nos LN e LP da carne de borregos alimentados com dietas suplementadas com óleo de peixe (2% de óleo de sardinha) e algas (3,53% de Trevera). C- controlo; OP – óleo de peixe; A – algas.	29

Índice de tabelas

Tabela 1: Principais ácidos gordos dos TG do tecido adiposo subcutâneo e dos PL do músculo em bovinos, ovinos e suínos alimentados com concentrado (% de ácidos gordos totais).....	3
Tabela 2: Composição básica das dietas fornecidas.....	16
Tabela 3: Concentração em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e a sua composição nas dietas (% total de ácidos gordos).	20
Tabela 4: Concentração de lípidos neutros (mg/g músculo) e a sua composição em ácidos gordos (% do total em ácidos gordos).....	22
Tabela 5: Concentração de lípidos polares (mg/g músculo) e a sua composição em ácidos gordos (% do total em ácidos gordos).....	23
Tabela 6: Somatórios e índices de atividade SCDI na fração de LN da carne.	24
Tabela 7: Somatórios e índices de atividade SCDI na fração de LP da carne.	25
Tabela 8: Concentração de lípidos da gordura subcutânea (mg/g) e a sua composição em ácidos gordos (% do total em ácidos gordos).....	26
Tabela 9: Somatórios e índices de atividade SCDI na gordura subcutânea.	27
Tabela 10: Relação entre a razão DHA:EPA nas dietas e nas frações lipídicas do músculo (lípidos neutros e polares) e gordura subcutânea dos borregos.....	30
Tabela 11: Composição das dietas experimentais com óleo de girassol (C), óleo de girassol + óleo de sardinha (OP) e óleo de girassol + extrato de <i>Schizochytrium</i> (A)..	43
Tabela 12: Efeito da suplementação dietética com óleo de girassol (C), óleo de girassol + óleo de sardinha (OP) e óleo de girassol + extrato de <i>Schizochytrium</i> (A) na performance de crescimento dos borregos Merino Branco.	44

Abreviaturas

A – Algas

AG - Ácidos gordos

AGE - Ácidos gordos essenciais

ALA - α – ácido linolénico

BH - Bioidrogenação

BI – Intermediários da bioidrogenação

C - Controlo

CLA – Acido linoleico conjugado

DHA - Ácido docosahexaenoico

EPA - Ácido eicosapentaenoico

GSC – Gordura subcutânea

ID - Intestino delgado

LA - Ácido linoleico

LCPUFA - Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa

LN - Lípidos neutros

LP - Lípidos polares

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados

OP - Óleo de peixe

PL - Fosfolípidos

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados

RBH - Bioidrogenação ruminal

SFA - Ácidos gordos saturados

SPE – Extração em fase sólida

TG - Triacilgliceróis

UFA - Ácidos gordos insaturados

Introdução

Ao longo dos anos tem vindo a crescer o interesse na composição lipídica da carne de ruminantes e dos seus efeitos para a saúde humana. As gorduras na dieta humana incluem todos os lípidos das plantas e dos tecidos animais possíveis de ser consumidos. Os ácidos gordos constituem os componentes principais destes lípidos e são necessários na nutrição humana como fonte de energia e para as atividades metabólica e estrutural (FAO, 2008).

Os produtos provenientes de ruminantes, apesar de serem uma fonte de nutrientes essenciais para a saúde humana, são caracterizados por possuírem elevadas concentrações de ácidos gordos saturados e menores de ácidos gordos insaturados comparativamente com os monogástricos. Por este motivo são muitas vezes considerados prejudiciais para a saúde quando consumidos em quantidades excessivas, podendo causar o desenvolvimento de diversas doenças como distúrbios cardiovasculares, aumento do risco de diabetes e determinados tipos de cancro.

A saturação das gorduras é uma consequência direta da biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados pelos microrganismos presentes no rúmen. Pesquisas realizadas ao longo dos tempos têm demonstrado evidências de que os ácidos gordos polinsaturados, presentes em pequenas quantidades nos tecidos dos ruminantes, representam um importante papel no organismo humano e portanto, têm sido alvo de grande interesse. Assim, o melhoramento do perfil de ácidos gordos nos produtos derivados destes animais traz vantagens e pode ser alcançado através da modificação do perfil de ácidos gordos durante o processamento da carne ou através da alteração da composição da dieta animal. Esta última hipótese foi utilizada no presente trabalho através da suplementação da dieta dos animais em estudo com produtos de origem marinha ricos em ácidos gordos ómega-3 – algas (Trevera) e óleo de sardinha.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARNE E EFEITOS DOS ÁCIDOS GORDOS ÔMEGA-3 NA SAÚDE HUMANA

1.1.1. Composição química da carne

A composição química da carne tem especial relevância na qualidade deste produto alimentar, sendo um componente importante na dieta humana, pois fornece proteína com um bom balanço em aminoácidos, ferro rapidamente disponível, vitaminas, principalmente do grupo B e outros minerais essenciais como o zinco (Williamson *et al.*, 2005). A carne proveniente de ruminantes, quando consumida em quantidades adequadas, é uma importante fonte de ácidos gordos (AG) benéficos para a saúde, fornecendo isómeros conjugados do ácido linoleico (CLA) e ácidos gordos polinsaturados ômega-3 (PUFA *n*-3) (Bessa *et al.*, 2007).

A composição química da carne é altamente variável, especialmente quando se trata do teor de lipídios. De uma maneira geral, a natureza e a quantidade de lipídios armazenados no músculo dependem da alimentação do animal, da digestão, da absorção intestinal, do metabolismo hepático e do sistema de transporte desses lipídios (Geay *et al.*, 2001). Existe uma grande diferença na composição lipídica dos produtos derivados dos ruminantes comparativamente com os monogástricos, visto que estes últimos tendem a depositar os lipídios na forma em que se apresentam na dieta, já nos ruminantes, os microrganismos ruminais por meio da biohidrogenação (BH) podem alterar a composição lipídica da dieta.

1.1.2. Ácidos gordos na carne

Em borregos o intervalo de valores de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) é, respetivamente, entre 40 e 55%, 35 e 45% e 1,5 e 7% (Food Science Australia, 2008). O ácido oleico (18:1 *cis*-9) é o AG maioritário em todas as carnes e contribui para mais de 30% dos ácidos gordos totais (Tabela 1).

A composição de AG dos tecidos dos ruminantes é mais complexa comparativamente com os monogástricos, contendo proporções mais elevadas de AG *trans*, AG conjugados, AG insaturados não pertencentes a nenhuma família ómega-3, ómega-6 ou ómega-9 e AG com um número ímpar de átomos de carbono e de cadeia ramificada - maioritariamente de origem microbiana. Estas variações são o resultado da ação das enzimas presentes nos microrganismos do rúmen que degradam a estrutura das plantas e os AG da dieta, produzindo uma vasta gama de produtos, alguns dos quais são absorvidos no intestino delgado (ID) e incorporados nos lípidos dos tecidos (Wood *et al*, 2008).

Os AG na carne são divididos em duas classes principais de lípidos: triacilgliceróis (TG) e fosfolípidos (PL). O primeiro é o principal componente lipídico do tecido adiposo (> 90%) em animais maduros e o segundo, é um constituinte das membranas celulares, contribui para 10% a 40% dos AG totais do músculo. Os PL têm uma concentração mais elevada de PUFA do que os TG. Os valores médios para a composição em AG nos TG do tecido adiposo subcutâneo e nos PL do músculo estão representados na Tabela 1, e derivam de estudos nos quais diferentes espécies foram alimentadas com concentrado à base de cereais. Como os animais de carne estão em contínuo crescimento depositam elevadas quantidades de gordura intra e intermuscular. Isto resulta num aumento da proporção de TG comparativamente aos PL, produzindo uma menor concentração de PUFA nos lípidos totais (Wood *et al*, 2008).

Tabela 1: Principais ácidos gordos dos TG do tecido adiposo subcutâneo e dos PL do músculo em bovinos, ovinos e suínos alimentados com concentrado (% de ácidos gordos totais).

Ácidos gordos	Triacilgliceróis do tecido adiposo subcutâneo			Fosfolípidos do músculo		
	Bovinos	Ovinos	Suínos	Bovinos	Ovinos	Suínos
14:0	3.8	3.0	1.4	0.4	0.5	0.7
16:0	26.1	21.3	24.8	14.9	15.4	17.5
16:1 <i>cis</i>^a	6.2	2.9	3.2	1.5	1.6	1.8
18:0	10.9	9.2	12.0	10.6	10.3	13.7
18:1 <i>cis</i>-9	36.5	32.0	35.7	22.0	25.8	17.2
18:2 <i>n</i>-6	1.9	1.9	13.3	18.4	12.3	25.3
18:3 <i>n</i>-3	0.2	1.7	1.3	0.4	5.0	1.0
20:4 <i>n</i>-6	n.d.*	n.d.*	0.2	10.4	5.6	9.1

*não detetado

^a todos os isómeros

Fonte: (Wood, *et al*, 2008)

1.1.3. Ácidos gordos ómega-3 e efeitos na saúde

Uma das famílias de PUFA mais importantes na saúde e nutrição humana é a dos AG $n-3$ (FAO, 2008). Os principais AG deste grupo presentes nos alimentos são o ácido linolénico ($18:3n-3$ - ALA), AG de cadeia longa (LCPUFA) e o EPA ($20:5n-3$ - ácido eicosapentaenoico) e DHA ($22:6n-3$ - ácido docosahexaenoico), AG de cadeia longa (LCPUFA).

O interesse nutricional dos AG $n-3$ tem aumentado significativamente nos últimos anos devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana. Este grupo de AG integra uma parte importante das membranas celulares ao longo do corpo e afeta as funções dos recetores celulares nestas membranas. Providencia o ponto inicial para a produção de hormonas que regulam a coagulação sanguínea, a contração e o relaxamento das paredes arteriais e a inflamação. Também se ligam a recetores nas células que regulam a função genética. Provavelmente devido a estes efeitos, os AG $n-3$ têm demonstrado ajudar a prevenir doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais, a controlar eczemas, artrite reumatoide e podem ainda desempenhar funções de proteção contra o cancro. Por estarem altamente concentrados no cérebro têm também demonstrado ser importantes para a função cognitiva e comportamental (Ehrlich, 2015).

1.1.4. Ácido linolénico e ácido linoleico

O ALA juntamente com o ácido linoleico ($18:2n-6$ – LA) são AG essenciais (AGE). O que significa que o organismo deve obtê-lo da dieta já que não é capaz de o sintetizar, pois os mamíferos em geral não têm a capacidade de introduzir duplas ligações entre o carbono 10 e o grupo metilo (FAO, 2008).

Uma das principais funções do ALA é o seu papel como precursor na síntese do EPA e do DHA, como se pode observar na Figura 1 (Spector, 2006). Fornecendo assim, a capacidade ao corpo humano de sintetizar outros AG $n-3$ essenciais ao organismo. No entanto a conversão de ALA em EPA e DHA é pouco eficiente devido à competição existente entre este e o LA pelas mesmas enzimas de dessaturação e alongação (Figura 1) (Cordain, 2015), sendo por isto recomendado a incorporação do EPA e do DHA na dieta a partir das fontes que os contêm naturalmente. São formados

em quantidades variáveis nos tecidos animais e fazem parte dos componentes dos lípidos marinhos, sendo estes últimos as principais fontes de obtenção.

O EPA é o precursor dos eicosanoides do grupo dos $n-3$, os quais têm vindo a demonstrar ter efeitos benéficos na prevenção de doenças cardíacas, arritmias e trombozes (Kinsella *et al*, 1990). Por sua vez os PL da retina e do cérebro são altamente enriquecidos em DHA, tendo um papel importante nas ações visuais e cognitivas (Spector, 2006).

Visto que, o LA é o PUFA predominante na dieta dos seres humanos e a ingestão de ALA é geralmente mais baixa, os níveis de LCPUFA $n-6$ derivados do LA no plasma e nas células tende a ser mais elevado do que os níveis de LCPUFA $n-3$ (FAO, 2008).

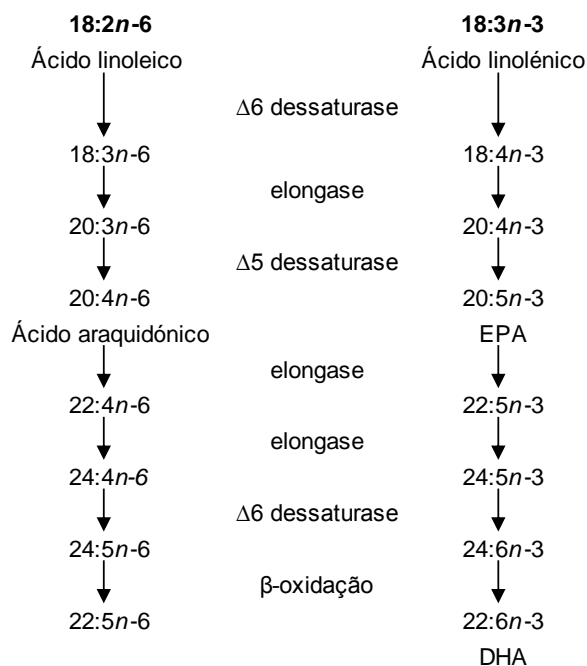


Figura 1: Vias metabólicas para a conversão do ácido linoleico e do ácido α -linolénico da dieta em ácidos gordos de cadeia longa. *Fonte:* (FAO, 2010)

1.1.5. Ácido linoleico conjugado

Um importante grupo de AG nos ruminantes é o ácido linoleico conjugado (CLA). Este tem vindo a demonstrar uma grande variedade de ações fisiológicas no corpo do animal e nos consumidores de carne (Wood *et al*, 2008). Os produtos

alimentares derivados de ruminantes são a maior fonte natural de isómeros de CLA na dieta dos humanos (Chin *et al.*, 1992). O CLA representa uma mistura de isómeros geométricos e posicionais do ácido octadecadienóico, de entre os quais se encontra o ácido ruménico (CLA 18:2 cis -9, $trans$ -11), que constitui o AG conjugado presente em maior quantidade no rúmen e também o principal CLA com efeitos benéficos para a saúde humana. Na carne, este isómero, deriva quer da RBH quer da síntese endógena por ação de uma enzima específica (Δ 9-desaturase) utilizando o ácido vacénico (18:1 $trans$ -11) como precursor, o qual deriva também do processo de BH no rúmen (Griinari *et al.*, 2000), como demonstrado na Figura 2.

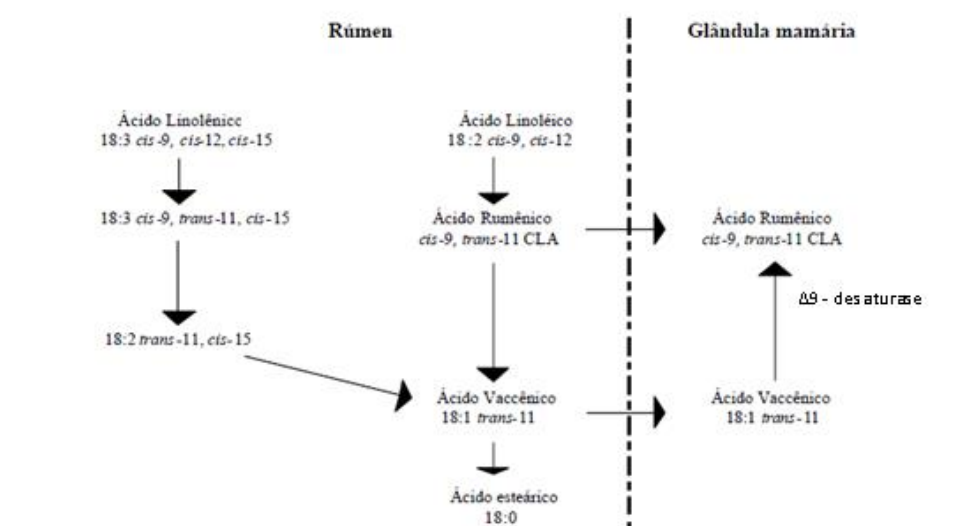


Figura 2: Esquema da síntese dos ácidos ruménico (18:2 cis -9, $trans$ -11) e vacénico (18:1 $trans$ -11) por via de biohidrogenação e via endógena. *Fonte:* (Costa *et al.*, 2009)

A biohidrogenação ruminal (RBH) dos lipídios da dieta é responsável pelos elevados níveis de SFA na carne de ruminantes, uma característica considerada indesejável para a saúde humana. Ironicamente, é também o processo metabólico diretamente responsável pelo aparecimento dos isómeros de CLA no rúmen, que podem depois transitar para o abomaso e intestino e posteriormente ser depositados na carne (Chilliard *et al.*, 2007). Trabalhos realizados anteriormente demonstraram que alguns dos isómeros de CLA são capazes de reduzir a incidência de tumores mamários, colón e pele (Belury, 1995). Outros efeitos positivos para a saúde humana associados a estes isómeros incluem redução da gordura corporal e divisão de nutrientes, efeitos anti diabéticos, redução do desenvolvimento de aterosclerose, aumento da mineralização óssea e modulação do sistema imunitário (Belury, 1995).

1.2. METABOLISMO LIPÍDICO DO RÚMEN

Os ruminantes são animais altamente diferenciados devido às suas adaptações digestivas e metabólicas, possuem uma elevada capacidade de fermentação devido à comunidade microbiana anaeróbia que habita no seu trato digestivo e com a qual têm uma relação de simbiose (Bessa, 2015). Esta flora microbiana permite a extração de energia das paredes vegetais e nutrientes de determinados alimentos (Bessa, 2015).

O estômago dos ruminantes encontra-se dividido em quatro compartimentos: sendo os três primeiros – rúmen (1), retículo (2) e omaso (3) – onde os alimentos são submetidos a uma extensa fermentação, prévia à digestão por enzimas que tem lugar mais tarde, no quarto compartimento, o abomaso (4), comumente designado também como “verdadeiro estômago”, pois exerce funções similares às do estômago dos monogástricos (Figura 3). Esta fisiologia do sistema digestivo fornece a capacidade aos ruminantes de aproveitarem com grande eficiência os alimentos que possuem na sua constituição uma grande percentagem de fibra.

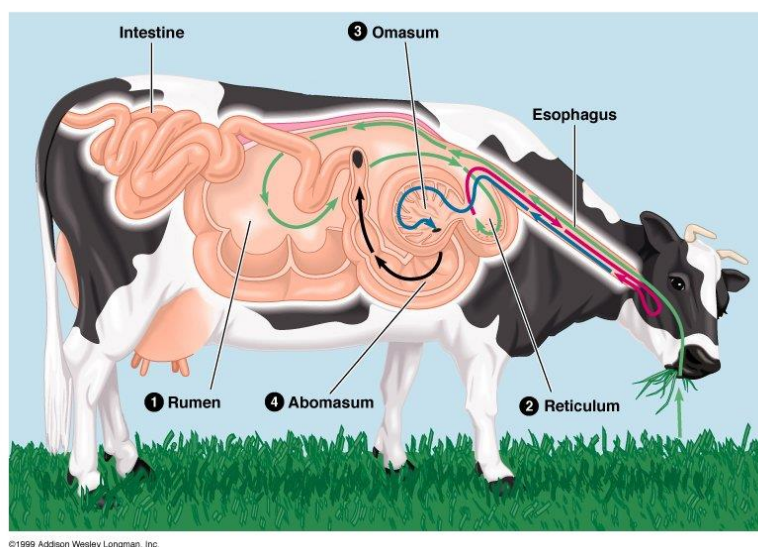


Figura 3: Representação esquemática do trato digestivo de ruminantes salientando os compartimentos gástricos (Addison Wesley Longman Inc, 1999).

Ruminantes e monogástricos diferem na proporção e composição de PUFA no tecido adiposo e no músculo porque, enquanto estes são praticamente inalterados durante a digestão nos monogástricos e incorporados diretamente nos tecidos, nos ruminantes são extensamente bioidrogenados pelos microrganismos do rúmen, como já referido anteriormente. Esta ação microbiana resulta, geralmente, em níveis baixos

de PUFA da dieta disponíveis para serem absorvidos nos tecidos corporais depois de passarem pelo rúmen onde grande parte são transformados noutros AG (Wood *et al.*, 2008).

As dietas dos ruminantes contêm geralmente 20 a 40 g de lípidos/kg MS. Os lípidos da dieta destes animais derivam dos alimentos vegetais, que constituem o principal componente da sua alimentação. A fração lipídica encontra-se predominantemente esterificada – galactolípidos e PL nas forragens e TG nos alimentos concentrados, como os grãos de cereais e bagaços de oleaginosas – e é constituída principalmente por PUFA, como o ALA nas forragens ou o LA nos alimentos concentrados.

1.2.1 Digestão lipídica

Os ruminantes são caracterizados pela sua elevada capacidade de transformação dos alimentos ingeridos no rúmen antes de chegarem ao ID e serem absorvidos e utilizados para produzir tecidos ou produtos como carne e leite.

Os lípidos provenientes da dieta são extensamente alterados no rúmen, pela ação dos microrganismos, através de dois processos conhecidos como lipólise e biohidrogenação, sendo este fenómeno responsável pelo baixo teor de PUFA e alto teor de SFA nos produtos provenientes dos ruminantes (Demeyer & Doreau, 1999).

Após a ingestão ocorre a lipólise, ou igualmente designada por hidrólise, dos lípidos da dieta por ação física de enzimas, denominadas lipases, associadas à membrana celular das bactérias (Demeyer & Doreau, 1999), libertando glicerol, galactose e AG, como demonstrado na Figura 4. Estas enzimas hidrolisam preferencialmente as ligações éster dos TG, PL e glicolípidos, levando à produção de diglicéridos e AG livres (AGL) (Shingfield *et al.*, 2010). A galactose e o glicerol são fermentados e prontamente metabolizados passando a ácidos gordos voláteis (Oliveira *et al.*, 2004). Os PUFA provenientes da dieta são libertados durante a lipólise, e ficam disponíveis para o processo de BH. A extensão da lipólise depende da natureza da gordura fornecida, sendo que os óleos vegetais são hidrolisados quase na totalidade (Church, 1988).



Figura 4: Representação esquemática dos produtos libertados durante a lipólise.

Só posteriormente à hidrólise é que ocorre a RBH dos PUFA, uma vez que para que esta ocorra é necessário que os AG se encontrem na sua forma livre (não esterificada). A BHR consiste em mecanismos de isomerização e hidrogenação dos ácidos gordos insaturados. Durante alguns anos, a única bactéria conhecida capaz de realizar o processo de BH era a *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler *et al.*, 1966). No entanto, à medida que os estudos se foram alargando, uma gama diversificada de bactérias capazes de biohidrogenar os PUFA foram isoladas.

O primeiro passo da RBH é a isomerização, ou seja, há uma modificação na configuração geométrica (de *cis* para *trans*) e na posição de algumas duplas ligações, formando outros intermediários. As isomerases são as enzimas responsáveis pela formação de duplas ligações conjugadas, resultantes do processo de isomerização. A hidrogenação ou redução das duplas ligações aumenta o grau de saturação dos AG até se formarem AG totalmente saturados (Bessa, 2015). Existe também a possibilidade de alguns AG serem apenas isomerizados e/ou parcialmente hidrogenados formando-se uma grande diversidade de produtos intermediários da biohidrogenação (BI), a maioria constituídos por duplas ligações *trans*, como representado no esquema da Figura 5. O que significa que os AG provenientes da dieta que atingem o ID poderão estar sob a forma de AG livres e saturados ou *trans* insaturados (Bessa, 2015).

Uma questão central ainda não muito bem esclarecida prende-se com a razão pela qual as bactérias ruminais levam a cabo a BH. A razão pela qual esta não é completa formando apenas 18:0? Porque é que os BI estão presentes no rúmen? A explicação mais aceite atualmente é que a BH é um mecanismo de defesa contra os efeitos tóxicos dos PUFA sobre os microrganismos ruminais. Esta ideia foi inicialmente proposta por Kemp e Lander e está suportada por numerosos dados derivados de estudos com bactérias puras (Maia *et al.*, 2010; Maczulak *et al.*, 1981).

O principal substrato para a BH em animais que estão em pastagem é o ALA, pois é o AG mais abundante presente nos glicolípidos das pastagens e forragens, por sua vez, animais cujas dietas possuem suplementação lipídica, o LA na forma de TG, geralmente é o principal substrato para a BH (Harfoot & Hazlewood, 1997; Jenkins *et al.*, 2008).

O metabolismo do LA e do ALA envolve pelo menos duas populações distintas de bactérias ruminais que, sob condições normais prossegue através da isomerização da dupla ligação *cis*-12, resultando na formação de CLA 18:2*c9t11* e 18:3*c9t11c15* conjugados, respetivamente (Figura 5). Os produtos conjugados são transitórios e sequencialmente reduzidos, formando-se desta forma o ácido vacénico (18:1*t11*) que por sua vez vai dar origem ao ácido esteárico (18:0) como produto final (Figura 5) da BH e que se acumula no rúmen, tornando-se o AG mais abundante neste compartimento quando se dá a absorção intestinal (Keeney, 1970). Contudo a RBH é frequentemente incompleta originando uma grande diversidade de BI, destacando-se o 18:1*t11* e o CLA 18:2*c9t11*, os quais podem ser absorvidos no trato digestivo, transportados para os tecidos através da circulação e depositados nos tecidos (Tanaka, 2005). Como já anteriormente referido, o 18:1*t11* nos tecidos pode servir de substrato para a atuação da enzima Δ^9 -dessaturase (redutase) para a síntese endógena de CLA 18:2*c9t11* (Pariza *et al.*, 2001).

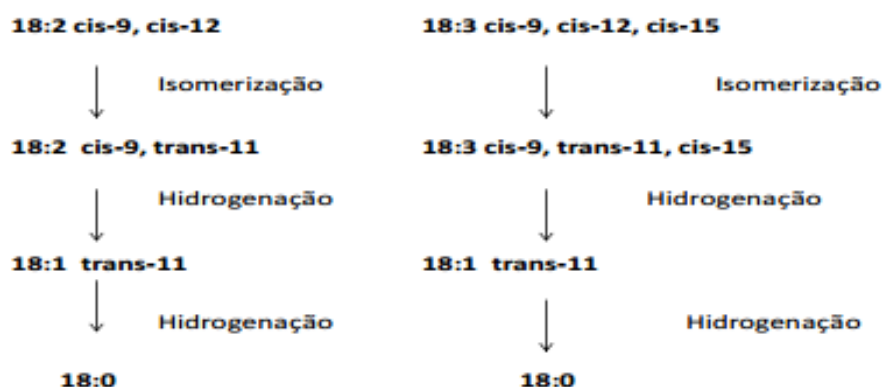


Figura 5: Esquema representativo das reações de isomerização e hidrogenação dos ácidos gordos essenciais linoleico e linolénico.

Algumas características da dieta – fornecimento de uma baixa quantidade de fibra e dieta rica em amido p.e. – podem favorecer uma redução no pH ruminal originando, frequentemente, uma mudança na população microbiana e consequente,

alteração do padrão de fermentação dos produtos finais da BH, resultando num maior fluxo de PUFA para o duodeno. Além disso o fornecimento de rações enriquecidas com PUFA, como óleos de origem vegetal, promovem a inibição da etapa final da BH. Portanto, quando são fornecidas dietas ricas em óleo, ocorre uma maior fuga de PUFA devido à superação da capacidade de hidrogenação dos microrganismos do rúmen, permitindo assim uma maior absorção e presença destes componentes nos produtos provenientes dos ruminantes (Palmquist & Mattos, 2006).

1.3. ABSORÇÃO E TRANSPORTE DE LÍPIDOS

Devido à baixa absorção ou modificação dos PUFA no omaso e no abomaso, o material lipídico disponível para absorção no ID é similar ao que deixa o rúmen (Moore & Christie, 1984). Estes lipídios consistem em aproximadamente 80-90% de ácidos gordos não esterificados ligados às partículas alimentares, não ionizados e insolúveis (Doreau & Chilliard, 1997). Os restantes componentes lipídicos, PL microbianos e pequenas quantidades de TG e glicolípidos, são hidrolisados por lipases intestinais e pancreáticas (Doreau & Ferlay, 1994).

A absorção de AG ocorre predominantemente no jejuno, mas previamente no duodeno, são adicionadas duas secreções – biliar e suco pancreático – à digesta. Estas secreções entram no duodeno através do ducto biliar e têm elevada importância na digestão e absorção dos lipídios. Para que estes processos ocorram de uma maneira eficiente formam-se micelas através da ação dos sais biliares. Estas soluções micelares têm como característica essencial e fisiologicamente importante a habilidade de dissolver (solubilizar) os AG insolúveis em água (Freeman, 1984). Uma vez que as micelas estão formadas são absorvidas pelas células epiteliais do jejuno, onde os AG irão ser re-esterificados em TG. A função das secreções biliar e pancreática é fundamental pois ajudam a aumentar o pH no jejuno que demonstra ser baixo tornando fraca a atividade das lipases pancreáticas.

Nos enterócitos o destino dos AG absorvidos é determinado pelo comprimento das cadeias carbonadas, ou seja, AG de cadeia inferior a 12 átomos de carbono entram diretamente no sistema e são transportados para o fígado pelo portal venoso (Hocquette & Bauchart, 1999). Pelo contrário, os AG com cadeia igual ou superior a 12 átomos de carbono são re-esterificados para formar TG e PL (Cuvelier *et al.*, 2005) através da combinação com o glicerol endógeno, produzido a partir do metabolismo da

glucose (Demeyer & Doreau, 1999). Os TG são agrupados em partículas lipoproteicas (quilomicrons ou lipoproteínas de densidade muito baixa, VLDL). Nos quilomicrons, tal como nas VLDL o núcleo contém TG, ésteres de colesterol e colesterol livre, e é rodeado por uma camada de PL, apoproteínas e colesterol (Brindley, 1984). Assim a secreção de quilomicrons é estimulada pelo aumento de gordura na dieta (Auboiron *et al.*, 1990) ou pelos PUFA da dieta (Harrison *et al.*, 1974). Os quilomicrons e as VLDL são subsequentemente transportados via linfa para a corrente sanguínea. Depois do sangue ser oxigenado, as lipoproteínas são libertadas para vários órgãos do corpo. As lipoproteínas podem ser agrupadas por ordem crescente de densidade: quilomicrons, VLDL, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de elevada densidade (HDL). Existe também uma lipoproteína de densidade intermédia (IDL), que possui uma densidade entre a VLDL e LDL. A função destas proteínas lipídicas é transportar os lípidos dos órgãos secretores (intestino e fígado) para os tecidos periféricos onde através das lipoproteínas lipases, os TG são quebrados e libertados sob a forma de AGL. Esses AG são utilizados pelos tecidos periféricos ou armazenados nos adipócitos. Em ruminantes, a composição química e a taxa de secreção de lipoproteínas estão entre os principais fatores que controlam a utilização de lípidos pelos tecidos e assim as características qualitativas e quantitativas da produção de carne.

1.4. DEPOSIÇÃO E SÍNTESE DE ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO E NA GORDURA SUBCUTÂNEA

A maior classe de lípidos no tecido adiposo (> 90%) são os TG ou lípidos neutros (LN). Por sua vez no músculo, os PL constituem a classe de lípidos com teor mais significativo. Estes constituintes das membranas celulares têm um conteúdo em PUFA superior comparativamente com o tecido adiposo (Wood *et al.*, 2008). Os LCPUFA são maioritariamente encontrados nos PL embora haja registos da sua presença nos LN do músculo e no tecido adiposo de ovinos (Enser *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2004).

De acordo com os resultados de vários estudos (Bas & Morand-Fehr, 2000; Banskalieva *et al.*, 2000; Bas & Sauvant, 2001), a gordura dos diferentes tecidos corporais é predominantemente saturada e monoinsaturada, uma vez que os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0) e oleico (18:1c9) constituem mais de 80% do total de AG. O 18:1c9 é o maioritário em todos os tecidos de armazenamento de lípidos e

alcança valores em torno dos 40% na gordura subcutânea e muscular. Esta elevada concentração é devida à extensa atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase sobre o 18:0. Os PUFA alcançam valores de 11% e 3% na gordura intramuscular e nos restantes tecidos de armazenamento de lípidos, respetivamente (Bas & Sauvant, 2001). A diferença entre estes valores está relacionada com o facto de que os PUFA se localizam maioritariamente nos PL das membranas das células musculares onde representam cerca de 30% dos AG (Bas & Sauvant, 2001) como já foi acima referido.

A composição da gordura intramuscular é de especial relevância devido ao seu efeito na qualidade da carne do ponto de vista da saúde humana. Nos PL do músculo a proporção de PUFA *n*-6/*n*-3 é variável em função do tipo de alimentação.

Os isómeros de CLA, em particular o CLA 18:2*c9t11*, são depositados principalmente nos TG e o aumento da sua concentração está associado ao grau de deposição (Raes *et al.*, 2003). O 18:1*t11* e o CLA estão em maior proporção nos LN do que nos PL e em maior quantidade no tecido adiposo do que no músculo.

Em ruminantes a síntese *de novo* ocorre principalmente no tecido adiposo. O principal precursor é o acetato da gordura intermuscular, subcutânea e abdominal. Para a gordura intramuscular o precursor principal é provável que seja a glucose (Smith *et al.*, 1984; Bonnet *et al.*, 2007).

1.5. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE FONTES DE ÁCIDOS GORDOS ÓMEGA-3 NAS DIETAS DOS RUMINANTES NA FRAÇÃO LIPÍDICA DA CARNE E GORDURA

Como já foi referido ao longo deste trabalho, a carne de ruminantes pode ser uma boa fonte de nutrientes com benefícios para a saúde, incluindo alguns AG como os LCPUFA e os isómeros do CLA. A diminuição dos SFA e o aumento dos AG benéficos para a saúde tem sido o tópico principal da investigação da carne de ruminantes.

Aumentar a ingestão de PUFA *n*-3 suplementando a dieta de ruminantes é a base para enriquecer a carne destes animais em LCPUFA *n*-3 embora a extensão do seu êxito seja limitada pela i) extensa BH dos PUFA *n*-3; ii) baixa conversão de 18:3 *n*-3 em LCPUFA; e iii) capacidade do músculo para incorporar e armazenar os LCPUFA *n*-3 (Bessa *et al.*, 2015)

1.5.1. Suplementação lipídica da dieta dos ruminantes

Devido ao facto de as gorduras dos ruminantes serem altamente saturadas, são necessárias estratégias para melhorar o perfil de AG na carne. A suplementação das dietas de ruminantes com fontes lipídicas ricas em PUFA parece ser um meio eficaz para melhorar o valor nutricional da carne, diminuindo os SFA e promovendo o enriquecimento em PUFA, como o CLA e os PUFA *n*-3 (Sinclair, 2007). A resposta à suplementação lipídica depende de múltiplos fatores, tais como a idade, genética e a duração da suplementação. Na carne de ruminantes, o objetivo principal para aumentar o conteúdo de AG saudáveis no músculo é aumentar a quantidade de *n*-3 sem afetar as restantes características da carne (resistência à oxidação, cor, sabor, etc.) e sem modificar a firmeza dos tecidos edíveis (Doreau *et al.*, 2011).

O potencial para alterar a composição de AG no músculo de ruminantes através da nutrição é determinado em larga extensão pela RBH dos lípidos da dieta. Vários fatores modulam este processo, incluindo a quantidade e tipo de suplementação lipídica (Jenkins *et al.*, 2008) e a dieta basal (Bessa *et al.*, 2005) resultando em diferenças na quantidade de PUFA que escapam da BH no rúmen e no tipo e distribuição dos BI. Estudos *in vitro* (Vasta *et al.*, 2009; Khiaosa-Ard *et al.*, 2009) e *in vivo* (Vasta *et al.*, 2009; Vasta *et al.*, 2010) demonstraram que algumas fontes de taninos condensados são eficazes na redução da BH dos PUFA da dieta, particularmente no seu último passo, resultando na acumulação de 18:1 ω 11. Tornando-se esta uma estratégia útil para melhorar o valor nutricional da gordura dos ruminantes.

As fontes principais para o fornecimento de AG nas dietas de ruminantes são, forragens (Bessa *et al.*, 2005) e pastagens (Santos-Silva *et al.*, 2002), óleos vegetais, sementes de oleaginosas, óleos de peixe, algas marinhas e suplementos lipídicos (Woods & Fearon, 2009). O efeito da suplementação de óleos vegetais na dieta de ruminantes foi revista por Ladeira *et al.* (2012), o qual demonstrou que a suplementação com sementes ou óleo de linhaça (ricos em ALA) pode aumentar a concentração de ALA nos tecidos dos ruminantes com a desejável diminuição da proporção *n*-6/*n*-3.

Fornecer fontes de lípidos ricas em 18:2 ω -6 e 18:3 ω -3 pode aumentar o conteúdo em 18:2 ω 9 ω 11 na carne de ruminantes (Bessa *et al.*, 2005, 2007). No entanto, fornecer óleo de linhaça (rico em 18:3 ω -3) parece ser menos eficaz no

aumento do 18:2 n -6 no músculo do que o óleo de girassol (rico em 18:2 n -6) (Bessa *et al.*, 2007). Bessa *et al.* (2007) observaram que a mistura dos óleos de girassol e linhaça pode ser uma boa abordagem para obter simultaneamente um enriquecimento em PUFA n -3 e CLA na carne de borregos. Todavia, a suplementação sistemática com fontes lipídicas ricas em 18:2 n -6 diminui o conteúdo em PUFA n -3, aumentando assim a proporção n -6/ n -3. Outros estudos indicam que a substituição de silagem ou alimento concentrado (*pellets*), ricos em LA, por pastagem, rica em ALA, melhora a composição de AG no músculo de ruminantes (Nuernberg *et al.*, 2005; Aurousseau *et al.*, 2004, 2007) aumentando e reduzindo as concentrações de AG n -3 e n -6 de cadeia longa, respetivamente.

No entanto, como a conversão de ALA em EPA e DHA nos tecidos é limitada, uma estratégia para aumentar a concentração destes LCPUFA na carne de ruminantes é a incorporação na dieta de óleos de peixe (Elmore *et al.*, 2005) ou microalgas (Hopkins *et al.*, 2014). Contudo sabe-se que a quantidade de LCPUFA absorvida é limitada pela extensa BH que ocorre no rúmen. De facto, mais de 90% do EPA e DHA disponíveis a partir do óleo de peixe não é recuperado no duodeno de novilhos (Shingfield *et al.*, 2010). Alguns estudos indicam contudo que os LCPUFA provenientes de microalgas podem ser muito menos hidrogenados no rúmen comparando com óleos de peixe (Sinclair *et al.*, 2005).

Um dos processos para aumentar a disponibilidade de EPA e DHA para absorção é proteger os lípidos da dieta da biohidrogenação ruminal (Cooper *et al.*, 2004) através do encapsulamento dos óleos emulsificados numa matriz proteica. Um exemplo desta forma de proteção, é o encapsulamento de óleo de peixe numa matriz sensível ao pH que permanece intacta no rúmen e é quebrada na presença de um pH mais baixo no abomaso libertando assim o óleo de peixe para uma possível absorção (Dunne *et al.*, 2011).

1.6. OBJETIVOS

O trabalho experimental realizado teve como objetivos:

- Avaliar o efeito da suplementação das dietas de borregos com lípidos de origem marinha (óleo de peixe e microalgas) na composição de AG da carne de borregos alimentados com uma dieta basal de luzerna

desidratada, com especial atenção para o CLA, AG *n*-3 e AG *n*-6 totais, EPA e DHA.

- Comparar o nível de deposição e o teor de ácidos gordos *n*-3 no músculo e na gordura subcutânea;
- Entender o interesse e a viabilidade da utilização de óleo de peixe e microalgas como suplemento das dietas de borregos;
- Compreender se a suplementação de microalgas é uma forma eficaz de aumentar o EPA e DHA na carne de borregos.

2. Materiais e Métodos

As amostras de músculo e gordura subcutânea utilizadas neste trabalho provieram de um ensaio realizado em Março de 2013 no INIAV, ex-Estação Zootécnica Nacional em Santarém, no âmbito do projeto PTDC/CVT/103934/2008: Estratégias nutricionais para aumentar a concentração de ácidos gordos bioativos na gordura edível de borregos, coordenado pelo Engenheiro José Manuel Bento Santos-Silva.

Em suma, no ensaio foram utilizados 36 borregos Merino Branco, divididos em 3 grupos de 12 animais cada. O ensaio foi realizado durante 6 semanas após uma semana de adaptação em que a dieta foi introduzida progressivamente. Os três grupos experimentais foram sujeitos a diferentes dietas: controlo, óleo de peixe e algas, como é possível verificar na Tabela 2.

Tabela 2: Composição básica das dietas fornecidas.

Tipo de dieta	Composição ¹⁾
A - Controlo	Alimento concentrado + 6% óleo de girassol;
B - Óleo de peixe	Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 2% óleo de sardinha;
C - Algas	Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 3,53 Trevera (algas).

¹⁾A composição pormenorizada das dietas encontra-se na Tabela 11 do Anexo I.

As amostras foram recolhidas *post-mortem* no matadouro experimental em Santarém e posteriormente liofilizadas e armazenadas à temperatura de - 20°C até ao seu processamento na FMV.

2.1. EXTRAÇÃO DE LÍPIDOS

Para a extração de lípidos do músculo foi utilizado o método de Folch *et al* (1957) com as adaptações efetuadas no Laboratório de Produção animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Para a realização deste procedimento pesou-se aproximadamente 200 mg de cada amostra de músculo liofilizado colocando-o em tubos de 16 ml. Adicionou-se 2 ml de metanol às amostras deixando-se humedecer cerca de 5 minutos e após isto colocou-se em banho de ultrassons a 30 °C durante 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 4 ml de diclorometano e após agitação foram colocadas novamente em banho de ultrassons a 30 °C durante 10 minutos. Após este período, centrifugou-se as amostras (10 minutos) para separar a fase sólida e retirou-se o máximo de solvente para um outro tubo de 23 ml. De seguida, adicionou-se à fase sólida 6 ml de diclorometano:metanol (2:1) e após agitação colocou-se em banho de ultrassons com posterior centrifugação e recolha de solvente. Este passo foi repetido uma vez mais. Após esta etapa, foi adicionado ao filtrado 3,6 ml de solução de cloreto de potássio 0,88 %, agitou-se e procedeu-se novamente à centrifugação. Retirou-se a parte inferior do filtrado para um balão de Erlenmeyer de 50 ml previamente tarado, levando-o ao evaporador rotativo para posterior análise ponderal.

2.2. SEPARAÇÃO DE LÍPIDOS NEUTROS E LÍPIDOS POLARES

As duas frações de lípidos foram separadas por extração em fase sólida (SPE), utilizando-se um sistema de “SPE vacuum manifold” e colunas de SPE Lichrolut Si, 40-63 µm, 500mg/3 mL (Figura 6). Após a introdução da amostra na coluna, eluiu-se a fração de LN com 20 ml de diclorometano, gota-a-gota, para um balão de Erlenmeyer e a fração de lípidos polares (LP) com 30 ml de metanol da mesma forma para um outro balão de Erlenmeyer. A confirmação da separação das duas frações lipídicas foi feita por cromatografia em camada fina utilizando-se hexano/éter/metanol/ácido acético (90:20:5:2, v/v/v/v) como eluente e as manchas foram detetadas através de vapores de iodo (Figura 7). Após a separação, o solvente foi removido em evaporador rotativo e os lípidos transferidos para tubos de ensaio para posterior transesterificação.



Figura 6: Sistema de “SPE vacuum manifold” e colunas de SPE Lichrolut Si, 40-63 μ m, 500mg/3 mL.



Figura 7: Cromatografia em camada fina utilizando-se hexano/éter/metanol/ácido acético (90:20:5:2, v/v/v/v) como eluente para deteção de lípidos neutros e polares através de vapores de iodo.

2.3. TRANSESTERIFICAÇÃO COMBINADA DOS ÁCIDOS GORDOS DO MÚSCULO E DA GORDURA SUBCUTÂNEA

A preparação dos AG (sob a forma de ésteres metílicos) por transesterificação dos LN, LP e da GSC foi efetuada em meio alcalino seguida de meio ácido, com metóxido de sódio 0,5 M em metanol e ácido clorídrico 10% em metanol, respetivamente. O procedimento utilizado foi adaptado de Raes *et al* (2001).

No caso dos lípidos neutros e polares utilizou-se entre 14,4 -29,2 mg de extrato lipídico, e para a GSC pesou-se cerca de 40 mg para tubos de ensaio. Adicionou-se 1 ml de toluene seco e de padrão interno (C19:0, 1 mg/ml em n-hexano). Posteriormente, adicionou-se 3 ml de metóxido de sódio 0,5 M agitou-se e colocou-se em banho de água a 50 °C durante 30 minutos. Após este período, adicionou-se 2 ml de HCL/metanol 10%, agitou-se e colocou-se novamente em banho de água mas desta vez a 70 °C durante 10 minutos. Deixou-se arrefecer a solução e adicionou-se 2

ml de água *Milli Q*. Posteriormente, adicionou-se 3 ml de n-hexano, agitou-se, centrifugou-se e recolheu-se o sobrenadante para um outro tubo já contendo cerca de 0,5 g de sulfato de sódio anidro. Este passo foi repetido uma vez mais. Após isto centrifugou-se e transferiu-se o solvente para outro tubo e evaporou-se em corrente de azoto a 37 °C. Seguido da evaporação adicionou-se 1 ml de n-hexano para GC e transferiu-se para um vial.

2.4. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Os ácidos gordos foram analisados por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID), utilizando-se um equipamento Shimadzu QP2010-plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar de sílica-fundida (SP-2560, 100 m × 0,25 mm diâmetro interno × 0,20 µm espessura da fase estacionária; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Durante a análise o injetor e o detetor foram mantidos a 250 °C e 280 °C, respetivamente. Utilizou-se hélio como gás de arraste a fluxo constante de 1 ml/min e foi injetada 1 µl de amostra. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 50 °C (mantida durante 1 min), aumentou depois a 50 °C/min até aos 150 °C (mantida durante 20 min), aumentou a 1 °C/min até aos 190 °C (mantida durante 1 min) e finalmente aumentou a 2 °C/min até aos 220 °C onde foi mantida durante 30 minutos.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os teores em lípidos no músculo e a composição em ácidos gordos foram comparados utilizando-se o tratamento (controlo, óleo de peixe, algas) como efeito fixo. O tratamento estatístico foi efetuado através do procedimento de modelos mistos “proc MIXED” do programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.6. RESULTADOS

2.6.1. Composição em ácidos gordos nas dietas fornecidas

De acordo com a Tabela 3 da página seguinte pode verificar-se que em termos de ácidos gordos totais (AGT) os valores variaram aproximadamente entre 3,5 e 4,9

mg/g de amostra. Os ácidos gordos presentes em maior quantidade nas dietas fornecidas aos três grupos de animais foram o 16:0, 18:1c9 e 18:2n-6. Relativamente aos ácidos gordos de cadeia muito longa, como era de esperar não foram detetados no controlo, no entanto o DHA (22:6n-3) apresentou uma maior percentagem na dieta que continha algas (A). Notou-se também, que os LCPUFA 20:5n-3 e 22:5n-6 não estavam presentes na dieta de controlo mas a sua percentagem aumentou nas dietas suplementadas com as fontes marinhas.

Tabela 3: Concentração em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e a sua composição nas dietas (% total de ácidos gordos).

	Tratamentos ¹⁾		
	C	OP	A
AGT (mg/g amostra)	4,84	3,50	4,94
12:0	0,28	0,25	0,17
14:0	1,80	0,73	1,82
15:0	0,20	0,16	0,29
16:0	16,79	29,20	15,75
16:1c9	2,32	0,27	0,26
17:0	0,27	0,41	0,20
18:0	3,75	7,65	3,10
18:1c9	26,15	38,98	17,82
18:1c11	2,34	2,35	1,32
18:2n-6	39,62	16,12	40,58
18:3n-3	6,48	2,11	7,56
20:5n-3	n.d. ²⁾	1,04	0,40
22:5n-6	n.d. ²⁾	0,33	3,46
22:6n-3	n.d. ²⁾	0,42	7,27

¹⁾ C – Alimento concentrado + 6% óleo de girassol (controlo); OP - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 2% óleo de sardinha; e A - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 3,53 Trevera (algas).

²⁾ Não detetado

2.6.2. Composição em ácidos gordos nas frações lipídicas da carne

O teor total de lípidos (mg/g músculo) está apresentado na Tabela 4. A composição detalhada de AG nas frações de LN e LP está apresentada nas Tabelas 4 e 5, respetivamente (páginas 23 e 24).

O teor de lípidos totais (LT) no músculo não foi afetado por nenhum dos tratamentos, apresentando um valor médio de 19,8 mg/g músculo. Da mesma forma, a concentração de LN e LP também não foi afetada pelos tratamentos, sendo que a

quantidade média para a primeira fração foi de cerca de 528 mg/g LT e para a segunda de 320 mg/g LT.

De acordo com os resultados houve diferenças significativas na maioria dos AG presentes nas frações lipídicas da carne consoante os tratamentos (Tabelas 4 e 5). De fato, dos 45 AG detetados nos LN e LP, somente 11 não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos.

Nos LN os AG presentes em maior quantidade foram o 18:1c9, o 16:0 e o 18:0, que juntos totalizam 72%, 65% e 66% do total de AG nos grupos controlo, óleo de peixe e algas, respetivamente, já nos LP estes AG totalizam 42%, 40% e 52% do total de AG. A percentagem mais elevada do 18:1c9 nos LN foi verificada no tratamento controlo, enquanto nos LP este tratamento apresentou a percentagem mais baixa comparativamente com os outros dois tratamentos. Contrariamente, nos LN a percentagem mais baixa do 16:0 foi verificada no tratamento controlo, enquanto nos LP este tratamento apresentou a percentagem menor comparando com os tratamentos com óleos marinhos. A proporção de 18:0 variou significativamente entre o tratamento com óleo de peixe (OP) e os dois outros, apresentando um valor inferior naquele. No caso do LP este AG demonstrou ser significativamente diferente para os três tratamentos.

O 18:1t11 aumentou nas duas frações, nos tratamentos com OP e A relativamente ao controlo, apesar de a maior percentagem se notar nos LN. O mesmo se verificou no CLAc9t11 em ambas as frações lipídicas, em que o controlo apresentou as percentagens mais baixas comparado com OP e A, no entanto nos LN a percentagem de CLAc9t11 foi significativamente mais elevada no OP comparado com a dieta das A. Observou-se também que o 18:2n-6 está maioritariamente representado na fração de LP do que na de LN. Para além dos referidos AG, os LP apresentaram também uma elevada percentagem de 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3 e 22:6n-3.

O EPA e DHA aumentaram a sua percentagem nas dietas com OP e A relativamente ao grupo de controlo nas duas frações lipídicas. No entanto, na fração de LN a diferença entre os tratamentos com fontes marinhas não foi significativa para o 20:5n-3. Já para o 22:6n-3 apenas o seu aumento na dieta das A foi significativo. O mesmo não aconteceu na fração de LP, onde se verificou que houve diferenças significativas entre os três tratamentos para o DHA.

Tabela 4: Concentração de lípidos neutros (mg/g músculo) e a sua composição em ácidos gordos (% do total em ácidos gordos).

	Tratamentos ¹⁾			EPM	p value
	C	OP	A		
LT (mg/g músculo)	17,79	19,99	21,70	1,349	0,137
LN (mg/g LT)	543,85	532,62	507,04	18,754	0,374
10:0	0,15	0,16	0,2	0,017	0,115
12:0	0,26 ^b	0,30 ^{ab}	0,40 ^a	0,036	0,037
i-14:0	0,05	0,04	0,05	0,006	0,508
14:0	3,36 ^b	4,00 ^{ab}	4,71 ^a	0,265	0,004
i-15:0	0,10 ^b	0,13 ^{ab}	0,16 ^a	0,013	0,008
a-15:0	0,14 ^b	0,15 ^b	0,20 ^a	0,015	0,022
14:1c9	0,09	0,10	0,10	0,011	0,876
15:0	0,40	0,38	0,46	0,028	0,111
i-16:0	0,14	0,13	0,15	0,011	0,3
16:0	23,26 ^b	25,52 ^a	25,99 ^a	0,617	0,008
i-17:0	0,29 ^b	0,32 ^{ab}	0,35 ^a	0,015	0,012
16:1c7	0,33	0,36	0,31	0,015	0,097
16:1c9	1,02 ^b	1,18 ^a	0,78 ^c	0,053	<0,001
a-17:0	0,39	0,33	0,37	0,019	0,114
17:0	0,83 ^a	0,75 ^b	0,83 ^a	0,021	0,008
i-18:0	0,10	0,08	0,09	0,008	0,347
17:1c9	0,30 ^a	0,26 ^a	0,21 ^b	0,016	0,002
18:0	16,29 ^a	13,00 ^b	15,35 ^a	0,507	<0,001
18:1 6 7/8	0,48 ^a	0,37 ^b	0,26 ^c	0,026	<0,001
18:1 9	0,48 ^a	0,46 ^a	0,35 ^b	0,019	<0,001
18:1 10	1,00 ^a	0,45 ^b	0,40 ^b	0,054	<0,001
18:1 11	3,78 ^b	12,76 ^a	13,28 ^a	0,776	<0,001
18:1 12	0,85 ^a	0,77 ^a	0,55 ^b	0,04	<0,001
18:1c9	32,59 ^a	26,71 ^b	24,22 ^c	0,77	<0,001
18:1 15	0,38 ^a	0,21 ^b	0,21 ^b	0,022	<0,001
18:1c11	0,72 ^b	0,94 ^a	0,70 ^b	0,025	<0,001
18:1c12	1,32 ^a	0,30 ^b	0,15 ^b	0,089	<0,001
18:1c13	0,10 ^a	0,07 ^b	0,04 ^c	0,006	<0,001
18:1 16 c14	0,54 ^a	0,29 ^b	0,30 ^b	0,028	<0,001
18:1c15	0,21	0,17	0,16	0,018	0,125
18:1c16	0,14 ^a	0,07 ^b	0,04 ^c	0,008	<0,001
18:2 outros	0,90 ^a	0,68 ^b	0,47 ^c	0,042	<0,001
18:2 11 c15	0,30 ^c	0,72 ^a	0,61 ^b	0,029	<0,001
18:2n-6	5,63 ^a	3,00 ^b	2,28 ^c	0,209	<0,001
20:0	0,09 ^b	0,12 ^a	0,14 ^a	0,01	0,008
18:3n-3	0,98 ^a	0,72 ^b	0,56 ^c	0,046	<0,001
20:1	0,07 ^b	0,14 ^a	0,09 ^b	0,008	<0,001
CLA c9 11	1,39 ^c	2,43 ^a	1,75 ^b	0,115	<0,001
20:2n-6	0,05 ^b	0,07 ^a	0,04 ^b	0,004	<0,001
18:3c9 11 c15	0,09	0,08	0,06	0,01	0,086
20:3n-9	0,02	0,02	0,04	0,004	0,066
20:3n-6	0,03 ^c	0,05 ^b	0,09 ^a	0,006	<0,001
20:3n-3	0,01 ^c	0,11 ^a	0,07 ^b	0,009	<0,001
20:4n-6	0,15 ^b	0,17 ^b	0,53 ^a	0,037	<0,001
20:4n-3	n.d. ²⁾	0,18 ^a	0,07 ^b	0,015	<0,001
20:5n-3	0,04 ^b	0,22 ^a	0,22 ^a	0,018	<0,001
22:5n-6	0,03 ^b	0,07 ^b	0,44 ^a	0,048	<0,001
22:5n-3	0,10 ^b	0,30 ^a	0,34 ^a	0,022	<0,001
22:6n-3	0,04 ^b	0,19 ^b	0,90 ^a	0,093	<0,001

Valores com diferentes letras (a, b, c) são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

¹⁾ C – Alimento concentrado + 6% óleo de girassol (controlo); OP - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 2% óleo de sardinha; e A - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 3,53 Trevera (algas).

²⁾ não detetado

Tabela 5: Concentração de lípidos polares (mg/g músculo) e a sua composição em ácidos gordos (% do total em ácidos gordos).

LP (mg/g LT)	Tratamentos ¹⁾			EPM	p value
	C	OP	A		
	326,92	313,12	320,45	19,0661	0,872
14:0	0,50 ^b	0,57 ^b	1,46 ^a	0,115	<0,001
i-15:0	0,04	0,06	0,08	0,012	0,093
a-15:0	0,05	0,05	0,09	0,012	0,1
14:1c9	0,03	0,06	0,05	0,012	0,432
15:0	0,18 ^b	0,20 ^b	0,36 ^a	0,019	<0,001
DMA16:0	0,11	0,64	0,05	0,281	0,328
16:0	15,36 ^b	16,33 ^b	23,78 ^a	0,769	<0,001
i-17:0	0,26	0,28	0,32	0,022	0,141
16:1c9	0,32 ^c	0,69 ^a	0,49 ^b	0,041	<0,001
a-17:0	0,15 ^b	0,11 ^b	0,22 ^a	0,02	0,001
17:0	0,47 ^b	0,52 ^b	0,69 ^a	0,021	<0,001
DMA18:0	0,14	0,42	0,21	0,198	0,6
17:1c9	0,10 ^b	0,15 ^a	0,15 ^a	0,011	0,021
18:0	13,57 ^a	8,76 ^c	11,39 ^b	0,393	<0,001
18:1c7/8	0,18	0,14	0,15	0,014	0,089
18:1c9	0,25 ^b	0,33 ^a	0,27 ^b	0,017	0,003
8:1c10	0,44 ^a	0,25 ^b	0,27 ^b	0,037	0,002
18:1c11	1,75 ^c	8,53 ^b	11,32 ^a	0,568	<0,001
18:1c12	0,53 ^b	0,63 ^a	0,47 ^b	0,036	0,011
18:1c9	13,05 ^b	15,06 ^a	16,76 ^a	0,641	0,001
18:1c15	0,46	0,4	0,51	0,064	0,433
18:1c11	2,25 ^b	3,30 ^a	1,90 ^c	0,098	<0,001
18:1c12	2,38 ^a	0,77 ^b	0,20 ^b	0,214	<0,001
18:1c16c14	0,18 ^a	0,13 ^{ab}	0,09 ^b	0,022	0,02
18:1c16	0,18 ^a	0,15 ^a	0,05 ^b	0,021	0,024
18:2c12	0,20 ^b	0,49 ^a	0,22 ^b	0,023	<0,001
18:2c11c15	0,08 ^b	0,27 ^a	0,32 ^a	0,025	<0,001
18:2n-6	30,02 ^a	21,51 ^b	9,25 ^c	0,896	<0,001
20:0	0,15	0,16	0,16	0,029	0,964
18:3n-3	1,44 ^a	1,47 ^a	0,62 ^b	0,071	<0,001
20:1	0,13	0,16	0,14	0,011	0,135
CLAc9c11	0,53 ^b	1,16 ^a	1,06 ^a	0,091	<0,001
20:2n-6	0,24 ^a	0,22 ^a	0,12 ^b	0,014	<0,001
20:3n-9	0,54 ^{ab}	0,62 ^a	0,38 ^b	0,066	0,041
20:3n-6	0,71	0,74	0,8	0,073	0,684
20:3n-3	n.d. ²⁾	0,16 ^a	0,02 ^b	0,013	<0,001
20:4n-6	8,12 ^a	5,27 ^b	7,01 ^a	0,523	0,002
20:4n-3	n.d. ²⁾	0,85 ^a	0,22 ^b	0,05	<0,001
20:5n-3	1,55 ^b	3,77 ^a	1,89 ^b	0,166	<0,001
22:5n-6	0,16 ^c	0,58 ^b	1,69 ^a	0,093	<0,001
22:5n-3	2,23 ^b	2,80 ^a	1,67 ^c	0,179	<0,001
22:6n-3	0,67 ^c	1,46 ^b	2,79 ^a	0,175	<0,001

Valores com diferentes letras (a, b, c) são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

¹⁾ C – Alimento concentrado + 6% óleo de girassol (controlo); OP - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 2% óleo de sardinha; e A - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 3,53 Trevera (algas).

²⁾ não detetado

Relativamente aos valores dos somatórios e índices SCDi das duas frações lipídicas estes estão representados nas Tabelas 6 e 7. Observou-se uma maior percentagem de SFA nos LN do músculo comparativamente com os PUFA. A proporção deste último grupo não diferiu consoante os tratamentos, apesar de o mesmo não se ter verificado relativamente ao grupo de SFA. No que diz respeito à fração de LP a quantidade de PUFA foi mais elevada do que a quantidade de SFA exceto para o tratamento com A. Os dois grupos apresentam diferenças significativas entre os três tratamentos. Da mesma forma verificou-se uma elevada percentagem de LCPUFA nos LP atingindo cerca de 16% do total de AG, não apresentando diferenças significativas entre tratamentos.

A atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase foi estimada a partir das percentagens de substratos e produtos na fração de LN e verificaram-se diferenças significativas entre alguns tratamentos. No geral os índices nas duas frações lipídicas foram mais baixos no tratamento com microalgas comparativamente com os outros dois tratamentos.

Tabela 6: Somatórios e índices de atividade SCDI na fração de LN da carne.

	Tratamentos ¹⁾			EPM	P value
	C	OP	A		
SFA ²⁾	44,65 ^b	44,23 ^b	48,07 ^a	0,747	0,002
BCFA ²⁾	1,20	1,18	1,38	0,071	0,118
MUFA ²⁾	44,40 ^a	45,59 ^a	42,15 ^b	0,598	0,001
PUFA ²⁾	9,74	9,00	8,41	0,409	0,086
LCPUFA ²⁾	0,45 ^c	1,37 ^b	2,68 ^a	0,199	<0,001
PUFA <i>n</i> -3	1,16 ^c	1,71 ^b	2,11 ^a	0,129	<0,001
PUFA <i>n</i> -6	5,87 ^a	3,36 ^b	3,37 ^b	0,237	<0,001
LCPUFA <i>n</i> -3	0,18 ^c	0,99 ^b	1,55 ^a	0,125	<0,001
LCPUFA <i>n</i> -6	0,24 ^b	0,36 ^b	1,09 ^a	0,08	<0,001
BI ²⁾	11,97 ^b	19,82 ^a	18,63 ^a	0,883	<0,001
SCDi-16:0 ³⁾	4,16 ^a	4,4 ^a	2,92 ^b	0,174	<0,001
SCDi-17:0 ³⁾	26,5 ^a	25,35 ^a	19,99 ^b	1,038	<0,001
SCDi-18:0 ³⁾	66,67 ^a	67,13 ^a	61,23 ^b	1,042	<0,001
SCDi-18:1 π 1 ³⁾	27,54 ^a	16,31 ^b	11,95 ^c	1,050	<0,001

Valores com diferentes letras (a, b, c) são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

¹⁾ C – Alimento concentrado + 6% óleo de girassol (controlo); OP - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 2% óleo de sardinha; e A - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 3,53 Trevera (algas).

²⁾ SFA – Ácidos gordos saturados; BCFA – Ácidos gordos de cadeia ramificada; MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – Ácidos gordos polinsaturados; LCPUFA – Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa; BI – Intermediários da bioidrogenação.

³⁾ Índices de atividade SCDi – C16/17/18/C8:1 π 1 obtidos a partir das equações:

SCDi-C16=16:1c9/(16:1c9+16:0)*100;

SCDi-C17=17:1c9/(17:1c9+17:0)*100;

SCDi-C18=18:1c9/(18:1c9+18:0)*100;

SCDi-C18:1 π 1=18:2c9 π 1/(18:2c9 π 1+18:1 π 1)*100.

Tabela 7: Somatórios e índices de atividade SCDI na fração de LP da carne.

	Tratamentos ¹⁾			EPM	P value
	C	OP	A		
SFA ²⁾	30,23 ^b	26,54 ^c	37,83 ^a	1,033	<0,001
BCFA ²⁾	0,46 ^b	0,41 ^b	0,71 ^a	0,042	<0,001
MUFA ²⁾	22,16 ^b	30,62 ^a	32,77 ^a	0,943	<0,001
PUFA ²⁾	46,94 ^a	41,53 ^b	28,48 ^c	1,505	<0,001
LCPUFA ²⁾	14,69	16,63	17,01	1,072	0,272
PUFA <i>n</i> -3	5,89 ^c	10,51 ^a	7,21 ^b	0,438	<0,001
PUFA <i>n</i> -6	39,72 ^a	28,48 ^b	19,30 ^c	1,206	<0,001
LCPUFA <i>n</i> -3	4,45 ^c	9,03 ^a	6,58 ^b	0,414	<0,001
LCPUFA <i>n</i> -6	9,70 ^a	6,98 ^b	10,05 ^a	0,666	0,004
DMA	0,22	0,9	0,15	0,397	0,387
BI ²⁾	7,13 ^b	13,17 ^a	14,89 ^a	0,636	<0,001
SCDi-16:0 ³⁾	2,04 ^b	4,04 ^a	2,04 ^b	0,212	<0,001
SCDi-17:0 ³⁾	17,8 ^b	21,65 ^a	17,85 ^b	1,172	0,048
SCDi-18:0 ³⁾	48,88 ^b	62,92 ^a	59,57 ^a	1,473	<0,001
SCDi-18:1 <i>t</i> 11 ³⁾	25,95 ^a	12,01 ^b	8,61 ^b	1,486	<0,001

Valores com diferentes letras (a, b, c) são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

¹⁾ C – Alimento concentrado + 6% óleo de girassol (controlo); OP - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 2% óleo de sardinha; e A - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 3,53 Trevera (algas).

²⁾ SFA – Ácidos gordos saturados; BCFA – Ácidos gordos de cadeia ramificada; MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – Ácidos gordos polinsaturados; LCPUFA – Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa; BI – Intermediários da bioidrogenação.

³⁾ Índices de atividade SCDi – C16/17/18/C8:1*t*11 obtidos a partir das equações:

SCDi-C16=16:1*c*9/(16:1*c*9+16:0)*100;

SCDi-C17=17:1*c*9/(17:1*c*9+17:0)*100;

SCDi-C18=18:1*c*9/(18:1*c*9+18:0)*100;

SCDi-C18:1*t*11=18:2*c*9*t*11/(18:2*c*9*t*11+18:1*t*11)*100.

2.6.3. Composição em ácidos gordos na gordura subcutânea

A quantidade de lípidos na gordura subcutânea (GSC) não variou entre tratamentos sendo o seu valor médio 578,2 mg/g amostra (Tabela 6). Tal como nas frações lipídicas também na GSC os AG que se apresentarem em maior quantidade foram o 16:0, 18:1*c*9, 18:0, 18:1*t*11, 18:2*n*-6 e o CLAc9*t*11. A percentagem de 18:1*t*11 foi relevantemente mais elevada nos tratamentos com óleos marinhos (cerca de 18%) comparado com o C (4,4%). Da mesma forma, a percentagem de CLAc9*t*11 foi mais baixa no C, e mais elevada no tratamento OP.

Observou-se que os AG 20:5*n*-3 e 22:6*n*-3 estão em pequena quantidade neste tecidos e que no primeiro não varia entre tratamentos mas no segundo varia significativamente sendo mais elevado no tratamento das A.

Tabela 8: Concentração de lipídios da gordura subcutânea (mg/g) e a sua composição em ácidos gordos (% do total em ácidos gordos).

	Tratamentos ¹⁾				p value
	C	OP	A	EPM	
Lípidos mg/g	537,81	585,84	613,89	43,972	0,4732
% Lípidos	53,78	58,58	61,39	4,399	4,734
10:0	0,15	0,18	0,19	0,014	0,107
12:0	0,24 ^b	0,25 ^b	0,43 ^a	0,057	0,042
i-14:0	0,05 ^{ab}	0,04 ^b	0,06 ^a	0,006	0,031
14:0	2,91 ^b	3,62 ^{ab}	4,22 ^a	0,345	0,04
i-15:0	0,10 ^c	0,15 ^b	0,18 ^a	0,01	<0,001
a-15:0	0,19 ^{ab}	0,16 ^b	0,23 ^a	0,02	0,034
14:1c9	0,1	0,07	0,07	0,011	0,057
15:0	0,55	0,46	0,52	0,033	0,103
i-16:0	0,15	0,12	0,14	0,012	0,133
16:0	21,65 ^b	23,95 ^a	22,48 ^{ab}	0,64	0,037
i-17:0	0,14 ^b	0,25 ^a	0,33 ^a	0,035	0,003
16:1c7	0,45	0,35	0,29	0,045	0,056
16:1c9	1,09 ^a	1,19 ^a	0,67 ^b	0,086	<0,001
a-17:0	0,31	0,34	0,39	0,032	0,17
17:0	1,14	1,02	1,1	0,055	0,273
i-18:0	0,05 ^b	0,05 ^b	0,08 ^a	0,008	0,014
17:1c9	0,45 ^a	0,25 ^b	0,22 ^b	0,033	<0,001
18:0	16,32 ^a	12,71 ^b	15,41 ^a	0,813	0,007
18:1t6/7/8	0,74 ^a	0,44 ^b	0,33 ^b	0,053	<0,001
18:1t9	0,63 ^a	0,52 ^b	0,37 ^c	0,036	<0,001
18:1t10	1,43 ^a	0,58 ^b	0,59 ^b	0,079	<0,001
18:1t11	4,39 ^b	18,24 ^a	17,54 ^a	1,105	<0,001
18:1t12	1,18 ^a	0,89 ^b	0,64 ^c	0,079	<0,001
18:1c9	29,53 ^a	22,63 ^b	22,01 ^b	0,958	<0,001
18:1t15	0,53 ^a	0,24 ^b	0,21 ^b	0,051	<0,001
18:1c11	0,80 ^b	1,06 ^a	0,74 ^b	0,069	0,003
18:1c12	2,00 ^a	0,28 ^b	0,09 ^b	0,166	<0,001
18:1c13	0,17 ^a	0,07 ^b	0,04 ^c	0,007	<0,001
18:1t16/c14	0,67 ^a	0,25 ^b	0,25 ^b	0,036	<0,001
18:1c15	0,22 ^a	0,14 ^b	0,14 ^b	0,015	<0,001
18:1c16	0,07 ^a	0,01 ^b	0,02 ^b	0,007	<0,001
18:2outros	0,76 ^a	0,61 ^b	0,57 ^b	0,049	0,02
18:2t11c15	0,28 ^c	0,87 ^a	0,74 ^b	0,044	<0,001
18:2n-6	7,38 ^a	2,83 ^b	2,17 ^b	0,341	<0,001
20:0	0,13 ^c	0,17 ^a	0,21 ^b	0,012	<0,001
18:3n-3	1,03 ^a	0,50 ^b	0,54 ^b	0,046	<0,001
20:1	0,10 ^b	0,22 ^a	0,13 ^b	0,013	<0,001
CLAc9t11	1,47 ^c	2,69 ^a	2,01 ^b	0,155	<0,001
18:3c9t11c15	0,07	0,06	0,06	0,008	0,54
20:3n-6	0,05 ^b	0,07 ^b	0,10 ^a	0,011	0,037
20:4n-6	0,22 ^b	0,14 ^b	0,37 ^a	0,03	<0,001
20:4n-3	n.d. ²⁾	0,24 ^a	0,13 ^b	0,027	0,01
20:5n-3	n.d. ²⁾	0,26	0,26	0,021	0,861
22:5n-6	n.d.	0,19 ^b	0,81 ^a	0,086	<0,001
22:5n-3	0,15 ^c	0,36 ^b	0,52 ^a	0,048	<0,001
22:6n-3	0,01 ^b	0,32 ^b	1,31 ^a	0,147	<0,001

Valores com diferentes letras (a, b, c) são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

¹⁾ C – Alimento concentrado + 6% óleo de girassol (controlo); OP – Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 2% óleo de sardinha; e A – Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 3,53 Trevera (algas).

²⁾ Não detetado.

Verificou-se também que a percentagem de SFA na gordura não varia entre tratamentos e é muito semelhante à percentagem de MUFA. Por sua vez os PUFA estão em menor quantidade (Tabela 9).

A estimativa da atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase calculada com os AG da GSC apresentou valores semelhantes aos verificados nos LN, em geral os índices foram mais baixos no tratamento com microalgas comparativamente com os outros dois tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9: Somatórios e índices de atividade SCDI na gordura subcutânea.

	Tratamentos ¹⁾			EPM	p value
	C	OP	A		
SFA²⁾	43,07	42,35	44,55	0,996	0,272
BCFA²⁾	0,99b	1,10 ^b	1,43 ^a	0,085	0,003
MUFA²⁾	44,55b	47,41 ^a	44,31 ^b	0,912	0,029
PUFA²⁾	11,4a	9,14 ^b	9,71 ^b	0,398	0,001
LCPUFA²⁾	0,41c	1,59 ^b	3,63 ^a	0,268	<0,001
PUFA <i>n</i>-3	1,19b	1,45 ^b	2,62 ^a	0,159	<0,001
PUFA <i>n</i>-6	7,63a	3,23 ^b	3,59 ^b	0,332	<0,001
LCPUFA <i>n</i>-3	0,16c	1,19 ^b	2,21 ^a	0,159	<0,001
LCPUFA <i>n</i>-6	0,25b	0,40 ^b	1,42 ^a	0,116	<0,001
BI²⁾	14,59b	25,83 ^a	23,55 ^a	1,368	<0,001
SCDi-17:0³⁾	27,71a	19,53 ^b	17,05 ^b	1,187	<0,001
SCDi-18:0³⁾	64,47a	63,94 ^a	58,83 ^b	1,618	0,035
SCDi-18:1³⁾	26,36a	13,01 ^b	10,46 ^b	1,171	<0,001

Valores com diferentes letras (a, b, c) são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

¹⁾ C – Alimento concentrado + 6% óleo de girassol (controlo); OP - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 2% óleo de sardinha; e A - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 3,53 Trevera (algas).

²⁾ SFA – Ácidos gordos saturados; BCFA – Ácidos gordos de cadeia ramificada; MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – Ácidos gordos polinsaturados; LCPUFA – Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa; BI – Intermediários da bioidrogenação.

³⁾ Índices de atividade SCDi – C16/17/18/C8:1 Δ 11 obtidos a partir das equações:

SCDi-C16=16:1c9/(16:1c9+16:0)*100;

SCDi-C17=17:1c9/(17:1c9+17:0)*100;

SCDi-C18=18:1c9/(18:1c9+18:0)*100;

SCDi-C18:1 Δ 11=18:2c9 Δ 11/(18:2c9 Δ 11+18:1 Δ 11)*100.

2.7. DISCUSSÃO

A adição de óleos ricos em PUFA na alimentação dos ruminantes é uma estratégia que tem sido utilizada para melhorar o perfil lipídico da carne, nomeadamente para aumentar o teor em LCPUFA *n*-3 e CLAc9 μ 11 (Sinclair, 2007). No entanto, como já foi referido ao longo deste trabalho, a BH no rúmen, a baixa conversão de 18:3 n -3 em LCPUFA *n*-3 e de 18:1 μ 11 em CLAc9 μ 11 e a capacidade do músculo para incorporar e armazenar os LCPUFA são fatores limitantes do sucesso desta estratégia.

É conhecido que a utilização de lípidos de origem marinha (óleos de peixe e microalgas) leva à acumulação de AG *trans* no rúmen e na carne, em particular AG de cadeia 18:1 (Bessa *et al.*, 2015). Esta acumulação resulta da inibição do último passo da RBH, ou seja, hidrogenação dos 18:1 em 18:0. Mecanismos de adaptação das bactérias ruminais a diferentes estímulos de stress, como é a sobrecarga de PUFA, ou mesmo o efeito tóxico que os PUFA poderão exercer sobre as bactérias responsáveis pela hidrogenação dos 18:1, são hipóteses possíveis para a inibição do último passo da biohidrogenação. Assim é de esperar uma redução na proporção de 18:0 e aumento de 18:1 *trans* nas frações lipídicas da carne e gordura dos animais alimentados com lípidos de origem marinha comparativamente com os outros. De fato, verificou-se uma redução na percentagem de 18:0 nos LN e na GSC nos animais alimentados com OP em relação aos sujeitos aos tratamentos C e A. Nos LP, verificou-se uma redução do 18:0 nos OP e A relativamente ao C. Resultados semelhantes foram descritos por Cooper *et al* (2004) nas frações lipídicas da carne e GSC de borregos alimentados com OP relativamente aos alimentados com óleo de linho.

A acumulação expressiva de 18:1 μ 11 em todas as frações lipídicas dos animais alimentados com lípidos marinhos relativamente ao controlo está assim concordante com o que era esperado. O elevado aumento dos 18:1 μ 11 deveu-se em grande parte ao aumento do 18:1 μ 11 (ácido vacénico). A presença deste AG nos tecidos é considerada desejável uma vez que ele serve de substrato para a enzima Δ 9-dessaturase na formação do CLAc9 μ 11 nos tecidos. De fato, verificou-se que nos grupos onde a disponibilidade de 18:1 μ 11 era maior (OP e A) a percentagem de CLAc9 μ 11 também foi mais elevada em todas as frações lipídicas. No entanto, os níveis mais elevados de CLAc9 μ 11 foram verificados no tratamento com OP. O que sugere uma menor atividade da enzima Δ 9-dessaturase no tratamento com A

relativamente ao do OP. De fato, a estimativa da atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase calculada através dos índices SCDi foi de uma forma geral mais baixa nos animais sujeitos ao tratamento com microalgas relativamente aos alimentados com OP. No entanto, é preciso ter em consideração que os animais sujeitos ao tratamento com A apresentavam baixa ingestão e baixo crescimento (Tabela 12 do Anexo II) o que certamente reduziu a atividade lipogénica.

Os ruminantes apresentam características únicas relativamente à incorporação de LCPUFA $n-3$ nos tecidos comparativamente com outras espécies, como foi recentemente sugerido por Bessa *et al.* (2015). De fato, diversos estudos verificaram que a incorporação de LCPUFA na carne e gordura de ruminantes, em particular os LCPUFA de cadeia $n-3$, se dá preferencialmente nos LP, e que o teor de LCPUFA $n-3$ quer nos LN quer na GSC é relativamente baixo ou apresenta-se em quantidades vestigiais (Noci *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2000; Scollan *et al.*, 2001; Wistuba *et al.*, 2007). Neste trabalho (Figura 8) também se verificou que a incorporação de LCPUFA $n-3$ nos LP da carne foi superior relativamente ao verificado nos LN, mesmo quando os animais foram alimentados com fontes ricas em LCPUFA $n-3$ (2% de óleo de sardinha ou 3,5% de microalgas). Contrariamente, noutras espécies como por exemplo, em suínos (Jaturasitha *et al.*, 2009), aves (Neudoerf *et al.*, 1967) ou ratos (Lin *et al.*, 1990) a adição de óleos de peixe na alimentação leva a uma deposição significativa de LCPUFA $n-3$ nos LN.

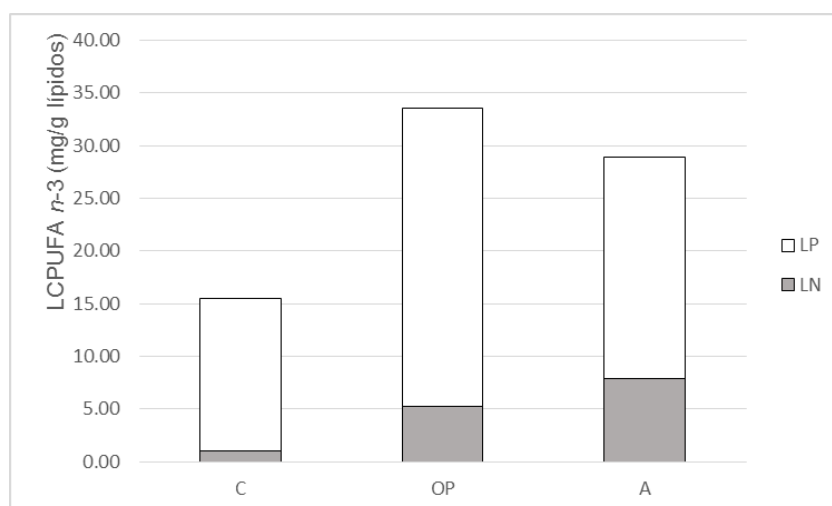


Figura 8: Teor em LCPUFA $n-3$ nos LN e LP da carne de borregos alimentados com dietas suplementadas com óleo de peixe (2% de óleo de sardinha) e algas (3,53% de Trevera). C- controlo; OP – óleo de peixe; A – algas.

Todavia, alguns estudos verificaram que a adição de microalgas ricas em DHA na dieta de borregos parece aumentar a incorporação dos LCPUFA *n*-3 nos LN e no tecido adiposo. De fato, no trabalho de Cooper *et al.* (2004) verificou-se que a inclusão de microalgas ricas em DHA na dieta de borregos levou a uma relevante incorporação de LCPUFA *n*-3 nos LN, contribuindo mesmo para 45% do total de LCPUFA *n*-3 da carne. No nosso trabalho, também se verificou um aumento dos LCPUFA *n*-3 nos LN nos animais alimentados com microalgas (ricas em DHA) comparativamente com os alimentados com óleo de sardinha, no entanto essa incorporação não atingiu os valores encontrados por Cooper *et al.* (2004).

Relativamente à incorporação dos diferentes LCPUFA *n*-3, nomeadamente do EPA e DHA, diversos estudos indicam que a incorporação de EPA nos LP é superior à do DHA, mesmo quando a dieta dos ruminantes contém mais DHA do que EPA (Ashes *et al.*, 1992; Ponnampalam *et al.*, 2001; Wachira *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2004; Demirel *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2011; Mandell *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2000; Scollan *et al.*, 2001; Zymon *et al.*, 2005; Noci *et al.*, 2007; Dunne *et al.*, 2011). Bessa *et al.* (2015) verificou por análise dos trabalhos disponíveis na literatura que mesmo com níveis elevados de DHA na dieta, o rácio DHA:EPA nos LP é de aproximadamente 1. Assim, estes autores sugeriram que os LN refletirão melhor os níveis de DHA e EPA da dieta comparativamente com os LP. Este trabalho está de acordo com o que foi sugerido por Bessa *et al.* (2015), pois como apresentado na Tabela 7, verificou-se um rácio DHA:EPA de 1,48 nos LP dos animais alimentados com microalgas (contendo 7,3% DHA e 0,4% EPA) e rácios de aproximadamente 4% e 5% nos LN e GSC dos mesmo animais, respetivamente. As razões para a diferente incorporação dos diferentes LCPUFA *n*-3 (EPA e DHA) nos tecidos dos ruminantes ainda não estão bem esclarecidas.

Tabela 10: Relação entre a razão DHA:EPA nas dietas e nas frações lipídicas do músculo (lípidos neutros e polares) e gordura subcutânea dos borregos.

DHA:EPA				
Tratamento	Dieta	Músculo		GSC
		LN	LP	
C		1	0,43	
OP	0,40	0,86	0,39	1,23
A	18,27	4,09	1,48	5,04

C – Alimento concentrado + 6% óleo de girassol (controlo); **OP** - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 2% óleo de sardinha; e **A** - Alimento concentrado + 4% óleo de girassol + 3,53 Trevera (algas). **LN** – lípidos neutros; **LP** – lípidos polares; **GSC** – gordura subcutânea.

Considerando no entanto que a incorporação de LCPUFA *n*-3 se dá maioritariamente nos LP, o enriquecimento de LCPUFA *n*-3 na carne irá depender da quantidade de LP no músculo e da sua capacidade de incorporação. Bessa *et al.* (2015) demonstrou que a quantidade de LP no músculo é relativamente constante e que a quantidade de AG nos LP varia entre 240 e 760 mg por 100 g de carne. No nosso trabalho, a quantidade de lípidos nos LP (nos 3 grupos experimentais) foi de cerca de 630 mg por 100 g de carne, encontrando-se dentro do intervalo de valores encontrado por Bessa *et al.* (2015). Relativamente à quantidade máxima de incorporação de LCPUFA *n*-3 nos LP, o valor mais alto reportado em carne de borrego foi de cerca de 20% e foi conseguido com dietas suplementadas com 30% de óleo de peixe protegido (Ashes *et al.*, 1992). No nosso trabalho, utilizou-se óleo de peixe não protegido, conseguindo-se a incorporação de 9% de LCPUFA *n*-3 nos LP. Outros autores também reportaram incorporações mais baixas, de 10,7% de LCPUFA *n*-3 nos LP na carne de borrego, com a utilização de óleo de peixe não protegido na dieta (Cooper *et al.*, 2004).

Todavia, a estratégia de adicionar OP (em particular, óleo de sardinha) na dieta de borregos resultou num aumento dos LCPUFA *n*-3 e do CLA α 9 β 11 na carne e na gordura comparativamente com a dieta C. Sendo que o enriquecimento em DHA foi mais elevado nos animais alimentados com microalgas. No entanto, como já foi referido, os animais alimentados com esta dieta apresentaram um desempenho produtivo mais baixo em relação ao grupo do OP, como se pode verificar na Tabela 12 do Anexo II, pelo que a incorporação do tipo de microalga utilizada em dietas de borregos terá ainda de ser otimizado.

2.8. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho podemos então dizer que a suplementação de lípidos de origem marinha na dieta dos borregos em estudo aumentou os LCPUFA n-3 e o CLAc9t11 nos tecidos estudados comparativamente à dieta controlo. No que diz respeito ao enriquecimento em DHA, este foi notório no grupo de animais alimentado com microalgas.

Contudo, a baixa ingestão do grupo alimentado com a dieta de microalgas deve ser tomada em atenção e portando a inclusão de outro tipo de microalgas não deve ser posto de parte no sentido de otimizar o desempenho produtivo dos animais, não deve ser posto de parte.

A estratégia de suplementar as dietas de ruminantes com lípidos de origem marinha poderá ser a longo prazo uma forma de melhorar o perfil de ácidos gordos na carne e por conseguinte tornar-se um produto mais saudável para a saúde humana. No entanto, é necessário não deixar de lado a hipótese de utilização de outros óleos de peixe alternativos ao de sardinha uma vez que este recurso se está a tornar cada vez mais escasso e caro.

Bibliografia

- Ashes, J.R., B.D. Siebert, S.K. Gulati, A.Z. Cuthbertson, e T.W. Scott. 1992. "Incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oil into tissue and serum-lipids of ruminants." *Lipids* 27, 629-631.
- Auboiron, S., D. Durand, P.M. Laplaud, D. Levieux, D. Bauchart, e M.J. Chapman. 1990. "Determination of the respective density distribution of low and high density lipoprotein particles in bovine plasma and lymph by immunoassay of apoproteins." *Reproduction Nutrition Development Journal* 227.
- Aurousseau, B., D. Bauchart, E. Calichon, D. Micol, e A. Priolo. 2004. "Effect of concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the M. longissimus thoracis of lambs." *Meat Science* 66, 531-541.
- Aurousseau, B., D. Bauchart, X Faure, A.L. Galot, S. Prache, D. Micol, e A. Priolo. 2007. "Indoor fattening of lambs raised on pasture: (1) Influence of stall finishing duration of lipid classes and fatty acids in the longissimus thoracis muscle." *Meat Science* 76, 241-252.
- Banskalieva, V., T. Sahlu, e A.L. Goetsch. 2000. "Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: A review." *Small Ruminant Research* 255-268.
- Bas, P., e D. Sauvant. 2001. "Variations de la composition des dépôts lipidiques chez les bovins." *INRA Production Animal* 311-322.
- Bas, P., e P. Morand-Fehr. 2000. "Effect of nutritional factors on fatty acid composition of lamb fat deposits." *Livestock Production Science* 61-79.
- Belury, M.A. 1995. "Conjugated dienoic linoleate: A polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties." *Nutrition Reviews* 53:83-89.
- Bessa, R.J.B., P.V. Portugal, I.A. Mendes, e J. Santos-Silva. 2005. "Effect of lipid supplementation on growth performance, carcass and meat quality and fatty acid composition of intramuscular lipids of lambs fed dehydrated lucerne or concentrate." *Livestock Production Science* 96, 185-194.

- Bessa, R.J.B., S.P. Alves, e José Santos-Silva. 2015. "Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat." *European Journal Lipid Science and Technology*, 117.
- Bessa, R.J.B., S.P. Alves, E. Jerónima, C.M. Alfaia, J.A.M. Prates, e J. Santos-Silva. 2007. "Effect of lipid supplements on ruminal biohydrogenation intermediates and muscle fatty acids in lambs." *European Journal Lipid Science and Technology* 109, 868-878.
- Bessa, Rui J. B. 2015. "A metabolização dos ácidos gordos polinsaturados no rúmen." *Lipid Animal*. <http://lipidanimal.fmv.utl.pt/index.php/pt/dossiers/150-biohidrogenacao>.
- Bonnet, M, Y. Faulconnier, C. Leroux, C. Jurie, I. Cassar-Malek, D. Bauchart, P. Boulesteix, D. Pethick, J.F. Hocquette, e Y. Chilliard. 2007. "Glucose-6-phosphate dehydrogenase and leptin are related to marbling differences among Limousin and Angus or Japanese x Angus steers." *Journal of Animal Science* 85, 1882-2894.
- Brindley, D.N. 1984. "Digestion, absorption and transport of fats: General principles." Em *Fats in Animal Nutrition*, de J. Wiseman, Cap. 4: 85-103. London, U.K.: Butterworths.
- Chilliard, Y, F Glasser, A Ferlay, L Bernard, J Rouel, e M Doreau. 2007. "Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat." *European Journal of Lipid Science and Technology* 109 828-855.
- Chin, SF, W Liu, K Albright, e MW Pariza. 1992. "Tissue levels of cis-9, trans-11 conjugated dienoic isomer of linoleic acid (CLA) in rats fed linoleic acid (LA)." *The FASEB Journal* 6 A1396.
- Choi, N.J., M. Enser, J.D. Wood, e N.D. Scollan. 2000. "Effect of breed on the deposition in beef muscle and adipose tissue of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids." *Animal Science* 71, 509-519.
- Church, DC. 1988. *El Ruminat: Fisiología Digestiva y Nutrición*. 3ª. Zaragoza, Espanha: Acribia.

- Cooper, S.L., L.A. Sinclair, R.G. Wilkinson, K.G. Hallett, M. Enser, e D. Wood. 2004. "Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid content of muscle and adipose tissue in lambs." *Journal of Animal Science* 82, 1461-1470.
- Cordain, Loren. 2015. *The Paleo Diet*. Acedido em 2015. <http://thepaleodiet.com/polyunsaturated-fatty-acids/>.
- Costa, R.G., R.C.R.E. Queiroga, e R.A.G. Pereira. 2009. *Influence of feed on the production on quality of goat milk*. Minas Gerais, Viçosa, Julho.
- Cuvelier, C., J.F. Cabaraux, I. Dufrasne, L. Istasse, e J.L. Hornick. 2005. *Production, digestion et absorption des acides gras chez le ruminant*. Vol. 149.
- Demeyer, D., e M. Doreau. 1999. *Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. Proceedings of the Nutrition Society*. Vol. 58.
- Demirel, G., A.M. Wachira, L.A. Sinclair, e R.G. Wilkinson. 2004. "Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids, breed and dietary vitamin E on the fatty acids of lamb muscle, liver and adipose tissue." *British Journal of Nutrition* 91, 551-565.
- Diaz, M.T., V. Caneque, C.I. Sanchez, e S. Lauzurica. 2011. "Nutritional and sensory aspects of light lamb meat enriched in n-3 fatty acids during refrigerated storage." *Food Chemistry* 124, 147-155.
- Doreau, M., D. Bauchart, e Y. Chilliard. 2011. "Enhancing fatty acid composition of milk and meat through animal feeding." *Animal Production Science* 51, 19-29.
- Doreau, M., e A. Ferlay. 1994. "Digestion and utilization of fatty-acids by ruminants." *Animal Feed Science Technology* 45:379-396.
- Doreau, M., e Y. Chilliard. 1997. "Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals." *British Journal of Nutrition* 78:S15-S35.
- Dunne, P.G., J. Rogalski, S. Childs, F.J. Monahan, D.A. Kenny, e A.P. Moloney. 2011. "Long chain n-3 polyunsaturated fatty acid concentration and color and lipid stability of muscle from heifers offered a ruminally protected fish oil supplement." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(9), 5015-5025.
- Ehrlich, Steven D. 2015. *University of Maryland Medical Center*. 8 de 5. <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/omega3-fatty-acids>.

- Elmore, J. Stephen, Sarah L. Cooper, M. Enser, D. S. Mottram, L. A. Sinclair, R. G. Wilkinson, e J. D. Wood. 2005. "Dietary manipulation of fatty acid composition in lamb meat and its effect on the volatile aroma compounds of grilled lamb." *Meat Science* 233-242.
- Enser, M., R.I. Richardson, J.D. Wood, B.P. Gill, e P.R. Sheard. 2000. "Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. ." *Meat Science*, 55 201-212.
- FAO. 2008. *Fats and fatty acids in human nutrition*. Geneva.
- . 2010. *Fats and fatty acids in human nutrtn*. Roma.
- Food Science Australia. 2008. "Meat Technology Update." 2 de Abril. http://www.meatupdate.csiro.au/data/MEAT_TECHNOLOGY_UPDATE_08-2.pdf.
- Freeman, C.P. 1984. "The digestion, absorption and transport of fats -- non-ruminants." Em *Fats in Animal Nutrition.*, de J. Wiseman, 105-121. London, U.K.: Butterworths.
- Geay, Y., D. Bauchart, J. Hocquette, e J. Culioli. 2001. "Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat." *Reproduction Nutrition Development* v. 41, p.1-26.
- Griinari, JM, BA orl, SH Lacy, PY Chouinard, KV Nurmela, e DE Bauman. 2000. "Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta(9)-desaturase." *The Journal of Nutrition* 130 2285-2291.
- Harfoot, CG, e GP Hazlewood. 1997. "Lipid metabolism in the rumen. In the rumen microbial ecosystem." *Blackie Academic & Professional, London* 382-426.
- Harrison, F.A., W.M.F. Leat, e A. Foster. 1974. "Absorption of maize oil infused into the duodenum of the sheep." *Proceedings of the Nutrition Society Journal* 33:103.
- Hocquette, J.F., e D. Bauchart. 1999. "Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals." *Reproduction Nutriton Development Journal* vol.:39, p. 27-48.
- Hopkins, D.L., E.H. Clayton, T.A. Lamb, R.J. van de Ven, G. Refshauge, M.J. Kerr, K. Bailes, P. Lewandowski, e E.N. Ponnampalam. 2014. "The impact of

supplementing lambs with algae on growth, meat traits and oxidative status.” *Meat Science* 98 135-141.

- Jaturasitha, S., R. Khiaosa-ard, P. Pongpiachan, e M. Kreuzer. 2009. “Early deposition of n-3 fatty acids from tuna oil in lean and adipose tissue of fattening pigs is mainly permanent.” *Journal of Animal Science* 87, 693-703.
- Jenkins, T.C., R.J. Wallace, P.J. Moate, e E.E. Mosley. 2008. “Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem.” *Journal of Animal Science* 86, 397-412.
- Keeney, M. 1970. *Lipid metabolism in the rumen*. Newcastle: A.T. Phillipson Oriel Press.
- Kemp, P., e D.J. Lander. 1984. “Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria.” *Journal of General Microbiology* 130:527-533.
- Kepler, C.R., K.P. Hirons, J.J. McNeill, e S.B. Tove. 1966. “Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*.” *the Journal of Biological Chemistry* 241:1350-1354.
- Khiaosa-Ard, R., S.F. Bryner, M.R.L. Scheeder, H.R. Wettstein, F. Leiber, M. Kreuzer, e C.R. Soliva. 2009. “Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal linolenic biohydrogenation by condensed tannins.” *Journal of Dairy Science* 92, 177-188.
- Kinsella, JE, B Lokesh, e RA. Stone. 1990. “Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: Possible mechanisms.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 52:1-28.
- Ladeira, M.M., O.R, Machado Neto, M.L. Chizzotti, D.M. Oliveira, e A. Chalfun Junior. 2012. “Lipids in the diet and the fatty acid profile in beef: A review and recent patents on the topic.” *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture* 4(2), 123-133.
- Lin, D.S., e W.E. Connor. 1990. “Are the n-3 fatty acids from dietary fish oil deposited in the triglyceride stores of adipose tissue.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 51, 535-539.

- Maczulak, A.E., B.A. Dehority, e D.I. Palmquist. 1981. "Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria." *Applied and Environmental Microbiology*, 42:856-862.
- Maia, M.R.G.; L.C. Chaudhary, C.S. Bestwick, A.J. Richardson, N. McKain, T.R. Larson, I.A. Graham, e R.J. Wallace. 2010. "Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium." Em *Butyrivibrio fibrosolvens Bmc Microbiology* 10.
- Mandell, I.B., J.G. Buchanan-Smith, B.J. Holub, e C.P. Campbell. 1997. "Effects of fish meal in beef diets on growth performance, carcass characteristics, and fatty acid composition of longissimus muscle." *Journal of Animal Science* 75, 910-919.
- Moore, J.H., e W.W. Christie. 1984. "Digestion, absorption and transport of fats in ruminant animals." Em *Fats in Animal Nutrition*, de J. Wiseman, 123-149. London, U.K: Butterworths.
- Neudoerf, T.S., e C.H. Lea. 1967. "Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on composition of individual lipids of turkey breast and leg muscle." *British Journal of Nutrition* 21, 691-714.
- Noci, F., F.J. Monahan, N.D. Scollan, e A.P. Moloney. 2007. "The fatty acid composition of muscle and adipose tissue of steers offered unwilted or wilted grass silage supplemented with sunflower oil and fish oil." *British Journal of Nutrition*. 97(3), 502-213.
- Noci, F., P. French, F.J. Monahan, e A.P. Moloney. 2007. "The fatty acid composition of muscle fat and subcutaneous adipose tissue of grazing heifers supplemented with plant oil-enriched concentrates." *J. Anim. Sci.* 85, 1062-1073.
- Nuernberg, K., G. Nuernberg, K. Ender, D. Dannenberger, W. Schabbel, S. Grumbach, W. Zupp, e H. Steinhart. 2005. "Effect of grass vs. concentrate feeding on fatty acid profile of different fat depots in lambs." *European Journal of Lipid Science and Technology* 107, 737-745.
- Oliveira, SG, JMC Simas, FAP Santos, e H. Imaizumi. 2004. "Suplementação com diferentes fontes de gordura em dietas com alta e baixa inclusão de concentrado para vacas em lactação." *Ars veterinaria*, 20 ed.: 160-168.

- Palmquist, D.L., e WRS Mattos. 2006. "Metabolismo de lípidos." Em *Nutrição de ruminantes*, 287-308. (Jaboticabal-SP).
- Pariza, MW, Y Park, e ME Cook. 2001. "The biologically active." *Research* 40, 283-298.
- Ponnampalam, E.N., A.J. Sinclair, A.R. Egan, S.J. Blakeley, e B.J. Leury. 2001. "Effect of diets containing n-3 fatty acids on muscle long-chain n-3 fatty acid content in lambs fed low and medium quality roughage diets." *Journal of Animal Science* 79, 698-706.
- Raes, K., S. De Smet, A. Balcaen, E. Claeys, e D. Demeyer. 2003. "Effect of diets rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on muscle lipids and fatty acids in Belgian Blue double-muscled young bulls." *Reproduction Nutrition Development Journal* 331-345.
- Raes, K., S.D. Smet, e D. Demeyer. 2001. "Effect of double-muscling in Belgian Blue young bulls on the intramuscular fatty acid composition with emphasis on conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids." *Journal of Animal Science* 73, 253-260.
- Rosa, H.J.D., O.A. Rego, C.C.G. Silva, e S.P. Alves. 2014. "Effect of corn supplementation of grass finishing of Holstein bulls on fatty acid composition of meat lipids." *Journal of Animal Science* 92, 3701-3714.
- Santos Silva, J.M.B., A.P. Portugal, C. Mateus, D. Ramirez-Cruzado, J.A. Prates, M.C. Bressan, M.T. Dentinho, et al. 2012. "The effects of the type of oil used as a supplement in lambs diet." Relatório final do Projeto PTDC/CVT/103934/2008, Santarém, Trial 3: 29-34.
- Santos-Silva, J., R.J.B. Bessa, e F. Santos-Silva. 2002. "Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs II. Fatty acid composition of meat." *Livestock Production Science* 77, 187-194.
- Scollan, N.D., N.J. Choi, E. Kurt, e A.V. Fisher. 2001. "Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle." *British Journal of Nutrition* 85, 115-124.

- Shingfield, K.J., L. Bernard, C. Leroux, e Y. Chilliard. 2010. "Role of trans fatty acids in nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants." *The Animal Consortium* 1140-1166.
- Shingfield, K.J., M.R.F. Lee, D.J. Humphries, e N.D. Scollan. 2010. "Effect of incremental amounts of fish oil in the diet on ruminal lipid metabolism in growing steers." *British Journal of Nutrition* 56-66.
- Sinclair, L.A. 2007. "Nutritional manipulation of the fatty acid composition of sheep meat: A review." *Journal of Agricultural Science* 145, 419-434.
- Sinclair, L.A., S.L. Cooper, S. Chikunya, e R.G. Wilkinson. 2005. "Biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids in the rumen and their effects on microbial metabolism and plasma fatty acid concentrations in sheep." *Journal of Animal Science* 81:239-248.
- Smith, S.B., e J.D. Crouse. 1984. "Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue." *The Journal of Nutrition* 114, 792-800.
- Spector, A.A. 2006. "Chapter 18: Essential Fatty Acids." Em *Biochemical, physiological and molecular basis of human nutrition.*, de M.H. Stipanuk, 518-540. Philadelphia, EUA: Philadelphia, Pa; Edinburgh: Elsevier Saunders.
- Tanaka, K. 2005. "Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions." *Journal of Animal Science* 76, 291-303.
- Vasta, V., D. Yáñez-Ruiz, M. Mele, A. Serra, G. Luciano, M. Lanza, L. Biondi, e A. Priolo. 2010. "Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumen sheep fed a diet containing added tannins." *Applied Environmental Microbiology* 76, 2549-2555.
- Vasta, V., H.P.S. Makkar, M. Mele, e A. Priolo. 2009. "Ruminal biohydrogenation as affected by tannins in vitro." *British Journal of Nutrition* 1-11.
- Vasta, V., M. Mele, A. Serra, M. Scerra, G. Lucioano, M. Lanza, e A. Priolo. 2009. "Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins." *Journal of Animal Science* 87, 2674-2684.

- Wachira, A.M., L.A. Sinclair, R.G. Wilkinson, e M. Enser. 2002. "Effects of dietary fat source and breed on the carcass composition, n-3 polyunsaturated fatty acid and conjugated linoleic acid content of sheep meat and adipose tissue." *British Journal of Nutrition* 88, 697-709.
- Williamson, C.S., R.K. Foster, S.A. Stanner, e J.L. Buttriss. 2005. *Red meat in the diet*. Nutrition Bulletin, 323-355.
- Wistuba, T.J., E.B. Kegley, J.K. Apple, e D.C. Rule. 2007. "Feeding feedlot steers fish oil alters the fatty acid composition of adipose and muscle tissue." *Meat Science Journal* 77, 196-203.
- Wood, J.D., M. Enser, A.V. Fisher, G.R. Nute, R.I. Richardson, e P.R. Sheard. 1999. "Manipulating meat quality and composition." *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 363-370.
- Wood, J.D., M. Enser, R.I. Richardson, e F.M. Whittington. 2008. "Chapter 5: Fatty acids in meat and meat products." Em *Fatty acids in foods and their health implications*, de Gustavo V. Barbosa-Cánovas, P. Michael Davidson, Mark Dreher, Richard W. Hartel, Lekh R. Juneja, Marcus Karel, Ronald G. Labbe, et al., 88-30. New York: CRC Press.
- Woods, V.B., e A.M. Fearon. 2009. "Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review." *Livestock Science* 126(1-3), 1-20.
- Zymon, M., J.A. Strzetelski, e J. Kowalczyk. 2005. "The effect of fish oil in calf diets on the fatty acid content of musculus thoracis intramuscular fat." *Journal of Animal Science* 14, 319-322.

Anexos

ANEXO I

Na Tabela 11 estão representados os ingredientes utilizados nas três dietas experimentais e a sua composição química.

Tabela 11: Composição das dietas experimentais com óleo de girassol (C), óleo de girassol + óleo de sardinha (OP) e óleo de girassol + extrato de *Schizochytrium* (A)

Ingredientes	C	OP	A
Trigo	10.55%	10.55%	10.15%
Sementes de soja 48%	10.95%	10.95%	9.82%
Luzerna desidratada	70.00%	70.00%	70.00%
Óleo de girassol	6.00%	4.00%	4.00%
Óleo de peixe	0%	2%	0%
Extrato de <i>Schizochytrium</i>	0	0	3.53%
Bicarbonato de sódio	0.50%	0.50%	0.50%
Carbonato de cálcio	1.30%	1.30%	1.30%
Minerais e vitaminas	0.30%	0.30%	0.30%
Sal	0.40%	0.40%	0.40%
Composição química			
Matéria seca (g/kg)	898	902	898
Proteína bruta	174	170	164
Fibra bruta ^b	214	199	208
Amido	104	142	120
Extrato etéreo	81	79	81
Cinza	103	102	108
Cálcio	14	16	16
Fósforo	3.0	3.2	2.8
Sódio	2.0	2.0	2.4
Potássio	9.6	9.1	9.7
Magnésio	2.3	2.4	2.0

Fonte: Santos Silva *et al.*, 2012

ANEXO II

A Tabela 12 corresponde aos índices zootécnicos relativos à performance de crescimento dos animais estudados.

Tabela 12: Efeito da suplementação dietética com óleo de girassol (C), óleo de girassol + óleo de sardinha (OP) e óleo de girassol + extrato de *Schizochytrium* (A) na performance de crescimento dos borregos Merino Branco.

	Tratamentos			SEM	p value
	C	OP	A		
Ingestão de matéria seca (g/d/kg wt ^{0.75})	93.8 ^b	91.4 ^b	51.7 ^a	9.59	0.004
GMD (g/d)	295.0 ^b	220.8 ^b	98.8 ^a	26.66	0.006
Relação alimento/ganho	5.02	5.45	12.2	2.62	0.177
Peso ao abate (kg)	31.4 ^c	27.8 ^b	22.4 ^a	0.99	0.002
Peso da carcaça quente (kg)	11.8	12.3	12.6	0.21	0.112
Peso da carcaça fria (kg)	11.4	12.0	12.3	0.23	0.115

Fonte: Santos Silva *et al.*, 2012

Valores com diferentes letras (a, b, c) são significativamente